Série A, n° 4690
N° d'ordre :
5538

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

SERGE JARD

1re THÈSE. — Étude des effets de la vasotocine sur l'excrétion de l'eau et des électrolytes par le rein de la Grenouille *Rana esculenta* L. : Analyse a l'aide d'analogues artificiels de l'hormone naturelle des caractères structuraux requis pour son activité biologique.

2e THÈSE. — Propositions données par la Faculté.

19 MARS 1966

Soutenues le **devant la Commission d'examen**

M. JOST..... *Président.*
MM. MOREL ..... *Examinateurs.*
CLAUSER .....

MASSON ET Cie, ÉDITEURS
LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
120, BOULEVARD SAINT-GERMAIN, PARIS, VIe
1966

Série A, nº 4690
Nº d'ordre :
5538

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

SERGE JARD

1re THÈSE. — Étude des effets de la vasotocine sur l'excrétion de l'eau et des électrolytes par le rein de la Grenouille *Rana esculenta* L. : Analyse a l'aide d'analogues artificiels de l'hormone naturelle des caractères structuraux requis pour son activité biologique.

2e THÈSE. — Propositions données par la Faculté.

Soutenues le **devant la Commission d'examen**

M. JOST..... *Président.*
MM. MOREL ..... *Examinateurs.*
CLAUSER .....

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN

MASSON ET Cie, ÉDITEURS
LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
120, BOULEVARD SAINT-GERMAIN, PARIS, VIe
1966

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

PROFESSEURS

Doyen ..... M. ZAMANSKY.

BRELOT	T	Analyse supérieure.
PRENANT	T	Anatomie et Histologie comparée.
GRASSÉ	T	Évolution des êtres organisés.
PRÉVOST	T	Chimie organique.
WYART	T	Minéralogie et Cristallographie.
TEISSIER	T	Zoologie.
MANGENOT	T	Biologie végétale (Orsay).
AUGER	T	Physique quantique et relativité.
MONNIER	T	Physiologie générale.
PIVETEAU	T	Paléontologie.
ROCARD	T	Physique (E.N.S.).
CARTAN	T	Mathématiques (E.N.S.).
LAFFITTE	T	Chimie générale.
N...	T	Géométrie supérieure.
COULOMB	T	Physique du globe.
Mlle COUSIN	T	Biologie animale (S.P.C.N.).
CHRÉTIEN	T	Chimie minérale.
BOCQUET	T	Zoologie.
KASTLER	T	Physique (E.N.S.)
EPHRUSSI	T	Génétique.
RIVIÈRE	T	Géologie (S.P.C.N.) et sédimentologie (Orsay).
GAUTHERET	T	Biologie végétale (P.C.B.).
LUCAS R.	T	Recherches physiques.
A. THOMAS	T	Biologie cellulaire.
ARNULF	T	Optique appliquée.
MORAND	T	Physique enseignement.
SOLEILLET	T	Physique (P.C.B.).
FORTIER	T	Mécanique exp. des Fluides.
DRACH	T	Zoologie.
QUENEY	T	Météor. et dynamique atm.
GALLIEN	T	Embryologie.
EICHORN	T	Botanique.
DE CUGNAC	T	Biologie végétale (S.P.C.N.).
Mlle CAUCHOIS	T	Chimie physique.
THELLIER	T	Physique du globe.
L'HÉRITIER	T	Biologie générale (Orsay).
GRIVET	T	Radioélectricité (Orsay).
PONCIN	T	Mécanique générale.
DU BREIL	T	Arith. et Théorie des Nombres.
QUELET	T	Chimie organique.
CAGNIARD	T	Géophysique appliquée.
CHAMPETIER	T	Chimie macromoléculaire.
CUVILLIER	T	Micropaléontologie.
JUNG	T	Géologie.
TRILLAT	T	Microscopie et diffraction élect.
WIEMANN	T	Chimie organ. et structure.
JACQUINOT	T	Spectroscopie et Phys. céleste (Orsay).
VASSY	T	Physique de l'atmosphère.
DESTOUCHES	T	Théorie physique.
AMIEL	T	Chimie générale.
HOCART	T	Minéralogie et Cristallogr.
J. P. MATHIEU	T	Physique optique.
COUTEAUX	T	Cytologie.
MAY	T	Zoologie.
CHOQUET	T	Théorie des fonctions et Topologie.
FELDMANN	T	Biologie végétale marine.
GUINIER	T	Physique des Solides (Orsay).
JOST	T	Physiologie comparée.
FORTET	T	Calcul des Probabilités et Physique mathématique.
SCHWARTZ	T	Calcul différentiel et intégral.
CHOUARD	T	Physiologie végétale.
MALAVARD	T	Aviation (Technique aéron.).
NORMANT	T	Synthèse organique.
BENARD	T	Chimie minérale.
BUVAT	T	Botanique (E.N.S.).
DUGUÉ	T	Statistique mathématiques.
SOULAIRAC	T	Psychophysiologie.
ULRICH	T	Physiologie végétale appliquée.
MARÉCHAL	T	Optique théor. et appliquée.
KIRRMANN	T	Théories chimiques.
CHADEFAUD	T	Botanique.
Mlle LE BRETON	T	Physiologie de la Nutrition.
LELONG	T	Application de l'analyse à la géométrie.
DEVILLERS	T	Anatomie et Histol. comparées.
EHRESMANN	T	Topologie algébrique.
FRANÇON	T	Physique (S.P.C.N.).
GLANGEAUD	T	Géographie phys. et géol.
DODEMENT	T	Mathématiques (M.G.P.).
PISOT	T	Technique math. de la phys.
ROCH	T	Géologie.
SCHATZMANN	T	Astrophysique.
TERMIER	T	Géologie générale.
ZAMANSKY	T	Mathématiques générales.
LENNUIER	T	Physique (M.G.P.).
RIZET	T	Génétique (Orsay).
ROUTHIER	T	Géologie appliquée.
Mme TONNELAT	T	Physique théorique.
DIXMIER	T	Mathématiques (M.P.C.).
SOUCHAY	T	Chimie générale.
AIGRAIN	T	Électrotechn. générale.
BRUSSET	T	Chimie systématique.
M. LÉVY	T	Physique théorique des hautes énergies (Orsay).
Mme CHAIX	T	Chimie biologique.
Mme HUREL-PY	T	Biologie végétale (P.C.B.).
PANNETIER	T	Chimie générale.
BRUN	T	Mécanique des Fluides I.
LEDERER	T	Chimie biologique (Orsay).
Mme DUBREIL	T	Mathématiques (Agrégation).
Mme LELONG	T	Mathématiques II (E.N.S.).
BELLAIR	T	Géologie (S.P.C.N.).
COTTE	T	Physique électricité.
J. E. DUBOIS	T	Chimie organique.
LAMOTTE	T	Zoologie (E.N.S.).
A. MICHEL	T	Chimie minérale (Orsay).
OLMER	T	Énergétique générale.
ROUAULT	T	Électricité (Orsay.)
GAUTHIER	T	Mécanique appliquée.
BARCHEWITZ	T	Chimie physique.
BROSSEL	T	Physique atomique
BUSER	T	Physiologie comparée.
CAMUS	T	Physiologie végétale.
CASTAING	T	Physique II Thermo (Orsay).
CURIEN	T	Minéralogie et cristallogr.
MOYSE	T	Physiologie végétale (Orsay).
Mme CHARNIAUX-COTTON	T	Évolution des êtres organisés.
POSSOMPES	T	Zoologie.
PULLMANN	T	Chimie quantique.
TEILLAC	T	Physique nucl. et radioactivité (Orsay).
TONNELAT	T	Biologie physico-chim. (Orsay).
VILLE	B	Économétrie.
WILLEMART	T	Chimie (P.C.B.).
DODE	T	Chimie (Orsay).
FREYMANN	T	Recherches physiques.
GUINOCHET	T	Biologie végét. S.P.C.N. (Orsay)
ROLLET	T	Chimie minérale.
Mlle JOSIEN	T	Chimie (S.P.C.N.).
CHEVALLEY	T	Géométrie algébrique et théorie des groupes.
ARNOULT	T	Électronique (Orsay).
CHAPELLE	T	Physique I (Orsay).
DELANGE	T	Mathématiques I (Orsay).
DENY	T	Mathématiques génér. (Orsay).
GERMAIN	T	Mécanique théor. des fluides.
LUCAS	T	Géologie.
ALLARD	T	Chimie physique.
BERTHELOT	T	Physique des particules fondamentales (Orsay).
BRICARD	T	Météor. et physique de l'atm.
Mme ALBE-FESSARD	T	Psycho-physiologie.
FRIEDEL	T	Physique des solides (Orsay).
M. JULIA	T	Études des moléculaires complexes.

LENDER	T	Biol. animale S.P.C.N. (Orsay).
MAGAT	T	Physico-chimie des radio-éléments.
Mlle QUINTIN	T	Électrochimie.
MONOD	T	Chimie du métabolisme.
BENOIT	T	Physiologie animale (Orsay).
DE POSEEL	T	Analyse numérique.
CHARLOT	T	Chimie analytique.
LEMÉE	T	Écologie végétale (Orsay).
GUÉRIN	T	Chimie M.P.C. (Orsay).
CHATELET	T	Chimie (P.C.B.).
JEAN	T	Physique nucléaire (Orsay).
MATTLER	T	Physique (S.P.C.N.).
BERGERARD	T	Zoologie (Orsay).
BERTEIN	T	Électronique (Orsay).
BOUISSIÈRES	T	Radiochimie.
Mme COUTURE	T	Thermodyn. et Mécan. phys.
ELLEMBERGER	T	Géologie des grandes régions du globe (Orsay).
FRANC	T	Biologie animale (P.C.B.).
SCHNELL		Botanique tropicale.
STLKOWSKI	T	Physiologie végétale.
ACHER	T	Chimie biologique.
BAUDOIN	T	Biologie animale (P.C.B.).
BEAUMONT		Biologie animale (S.P.C.N.).
BLAMONT		Géophysique ionosphère.
BOUREAU	T	Botanique.
D. CURIE		Physique (M.G.P.).
DURAND-DELGA	T	Géologie.
FRÉON	T	Chimie organique (Orsay).
HELLER	T	Physiologie végétale.
TORTRAT	T	Calcul des probabilités.
CAILLEUX	T	Géologie (S.P.C.N.).
MAGNAN		Physique électricité.
DAUDEL	T	Mécanique ondulatoire appliquée à la chimie théor. et à la phys. nucléaire.
Mlle FOURCROY		Biologie végétale (S.P.C.N.).
Mme CHOQUET-BRUHAT		Mécanique analytique et mécanique céleste.
Mlle VEIL	T	Physiologie générale.
LWOFF	T	Microbiologie.
SIESTRUNCK	T	Mécan. phys. et expérimentale.
LACOMBE	T	Métallurgie des métaux nucléaires (Orsay).
BROCHARD	T	Physique P.C.B. (Orsay).
CABANNES	T	Mécanique générale.
LESIEUR	T	Mathématiques I (Orsay).
MAZET	T	Mécanique générale (Orsay).
CAIRE		Géographie phys. et géom. dynam.
COMOLET		Mécanique des fluides.
CORABŒUF	T	Physiologie animale (Orsay).
DELLOUE	T	Physique de l'exosphère.
GORENFLOT		Botanique II (Orsay).
HOUILLON		Biologie animale (P.C.B.).
J. JULLIEN		Chimie S.P.C.N. (Orsay).
MALGRANGE	T	Technique mathém. de la Physique (Orsay).
OLIVIER		Anthropologie.
NOZERAN	T	Botanique II (Orsay).
BLANC-LAPIERRE	T	Physique E.N.S. (Orsay).
CHEVAUGEON	T	Botanique (Orsay).
KAHANE	T	Mathématiques (Orsay).
SAMUEL	T	Mathématiques (E.N.S. fém.).
KOURGANOFF	T	Astronomie (Orsay).
THIRY	T	Mécanique céleste.
ABELES		Physique (S.P.C.N.).
AMAT		Physique (P.C.B.).
AUBOIN	T	Géologie.
Mme BENOIT-GUEUTAL	T	Physique nucléaire et radioactivité (Orsay)
BOUGIS		Biologie marine Villefranche-sur-Mer.
BRUHAT	T	Mathématiques (M.P.C).
BRUNN	T	Géologie historique (Orsay).
CHABBAL	T	Physique M.G.P. (Orsay).
DEHEUVELS	T	Mathématique propédeutique.
D'ESPAGNAT	T	Physique théorique (Orsay).
FURON	T	Géologie (S.P.C.N.).
Mme GANS	T	Génétique.
GENEVES		Biologie végétale (P.C.B.).
GUILBERT		Physique (C.U.S. Orléans).
HUPE	T	Pétrographie.
HOLLANDE	T	Biologie génétique.
LIONS	T	Analyse numérique.
MAITTE	T	Chimie (P.C.B.).
MEYER		Physique propédeutiqu
NICOLAS		Géologie appliquée.
PANIGEL		Biologie générale.
RAVIER		Pétrographie.
ROSEAU	T	Mécanique théorique des fluides
ROUBINE		Électronique.
SILBER	T	Chimie (P.C.B.).
UEBERSFELD	T	Électronique.
YVON	T	Théories physiques.
HERVE	T	Mathématiques.
NÉRON	T	Mathématiques M.P.C. (Orsay
Mme PECKER-WIMEL	T	Astrophysique.
BALKANSKY		Physique (M.P.C.).
LE CORRE	T	Électricité.
DELCROIX	T	Physique théorique (Orsay).
GOURDIN		Physique théorique des hautes énergies (Orsay).
LEHMANN	T	Phys. expér. des hautes énergies (Orsay).
NATAF	T	Physique nucléaire et radioactivité (Orsay).
ECHALIER		Biologie animale (P.C.B.).
BARRAUD		Physiologie cellulaire.
LIORET		Physiologie végétale (Orsay).
DARS		Géologie structurale et Géologie appliquée.
CAMEFORT	T	Botanique (agrégation).
VICHNIEWSKY	T	Mécanique industrielle.
BLAQUIÈRE		Électronique (Orsay).
ARNOUS	T	Physique théorique.
TATIBOUET		Chimie (C.S.U. Orléans).
MALLIAVIN	T	Mathémat. propéd. (Orsay).
GAUDEMAR		Chimie propédeutique.
PEREZ Y JORBA		Physique exp. des Hautes Énergies (Orsay).
DAVID	T	Chimie (agrégation Orsay).
BROUSSE	T	Mécanique théorique.
ROSCH	T	Astronomie.
GUY	T	Physique expérimentale.
LAZARD		Mathématiques (M.P.C.).
Pierre MOREL		Physique (M.P.C.).
ARSAC		Programmation.
LEFEBVRE		Chimie (M.P.C.).
CHAPEVILLE		Biochimie.
BENOIT		Physique (C.P.E.M.).
RIO		Chimie (C.P.E.M.).
JAUZEIN		Géologie (E.N.S.).
G. PRÉVOST		BV (C.P.E.M.).
P. FAVARD		BA (C.P.E.M.).
VILKAS		Chimie (C.P.E.M.).
Mlle FICINI		Chimie (C.P.E.M.).
LEQUEUX		Astronomie.
COHEN TANNOUDJI		Physique (M.P.C.).
TAVERNIER		Physique(C.P.E.M.).
Mme ROIZEN		Physique (S.P.E.M.).
M. DURAND		BA (S.P.C.N.).
PASCAUD		Physiologie.
Mme PETIT		BA (C.P.E.M.).
BROUSSE		Géologie (Orsay).
CAGNIAC		Physique agrégation (Orsay).
LEBERRE		Zoologie (Orsay)
SCHEFFER		Microbiologie (Orsay).
DE GENNES		Physique des solides (Orsay).
RIOU		Physique nucl. expér. (Orsay).
CLAUSER		Chimie biologique (Orsay).
CHEVALIER		Physiologie animale (Orsay).
JANCOVICI		Physique atomique (Orsay).
FALK-VAIRANT		Physique nucléaire (Orsay).
FETIZON		Chimie propédeutique (Orsay).
CERF		Mathématiques (Orsay).
LURCAT		Physique.
RIGAUDY		Chimie (S.P.C.N.).
SIGWALT		Chimie (S.P.C.N.).
FOURNET		Électricité générale.
COLLONGUES		Chimie (C.P.E.N.).
DUBERT		Biochimie.
LAVOREL		Biologie physico-chimique.
MOREL F.		Physiologie comparée.
TALBOT		Génétique chimique.
Mme NOUGARÈDE		Botanique.
FRANÇOIS		Zoologie.
IVANOFF		Océanographie physique.
CADIOT		Chimie organique.
BARUCH		Physique propédeutique.
NOZIÈRES		Physique générale.
BOK		Physique propédeutique.
SLONIMSKI		Génétique.

Le Secrétaire général..... R. POULLAIN

AVANT-PROPOS

Ce travail a été réalisé au Département de Biologie du Commissariat à l'Énergie Atomique. Avant d'en commencer l'exposé, nous tenons à exprimer notre gratitude à Monsieur le Professeur COURSAGET, Directeur du Département de Biologie, qui nous a accueilli en stage de longue durée dans son service depuis 1959.

Nous assurons de notre profond attachement, notre maître, le Pr François MOREL, auquel nous devons toute notre initiation à la Recherche Physiologique. Par l'intérêt constant qu'il nous a toujours témoigné, Monsieur le Pr MOREL a largement contribué à la réalisation de ce travail dont il nous a suggéré le sujet et l'orientation générale. Qu'il nous soit permis, en cette occasion, de lui exprimer notre profonde reconnaissance.

Monsieur le Pr JOST, en nous accueillant dans son service d'enseignement, nous a donné l'occasion de contacts fréquents et fructueux. Il nous a fait aujourd'hui l'honneur d'accepter de présider ce jury. Nous sommes heureux de l'en remercier et de lui exprimer notre gratitude.

Monsieur le Pr CLAUSER a bien voulu faire partie de ce jury, c'est pour nous l'agréable occasion de le remercier des encouragements qu'il nous a donnés.

Que tous nos camarades de laboratoire, enfin, soient assurés de notre amitié reconnaissante pour les suggestions et l'aide efficace qu'ils nous ont apportées.

Étude des effets de la vasotocine sur l'excrétion de l'eau et des électrolytes par le rein de la grenouille *Rana Esculenta* L. : Analyse à l'aide d'analogues artificiels de l'hormone naturelle des caractères structuraux requis pour son activité biologique

PAR

S. JARD

(*Département de Biologie, Commissariat à l'Énergie Atomique, Saclay, Seine-et-Oise.*)

SOMMAIRE

Pages

INTRODUCTION 5

MATÉRIEL ET MÉTHODES 7

I. Choix des conditions biologiques 7

II. Principe de la méthode des clearances comparées et son application à l'étude de l'excrétion hydrominérale 8

III. Techniques expérimentales 9

A. Matériel biologique 10

B. Préparation des animaux 10

C. Protocole général des expériences 11

D. Traitement des échantillons 12

E. Mode de calcul des clearances 12

F. Produits utilisés 13

PREMIÈRE PARTIE : ACTIONS DE LA VASOTOCINE ET DE DOUZE DE SES ANALOGUES SUR L'EXCRÉTION DE L'EAU ET DES ÉLECTROLYTES PAR LE REIN DE LA GRENOUILLE 15

CHAPITRE PREMIER. — CARACTÉRISTIQUES DE L'EXCRÉTION HYDROMINÉRALE CHEZ LA GRENOUILLE HYDRATÉE 17

A. Anatomie et organisation structurale du rein de la Grenouille 17

B. Le débit urinaire et la filtration glomérulaire 18

C. Pression osmotique de l'urine, clearance osmotique et clearance de l'eau libre 20
D. Excrétion du sodium et du potassium 21
E. Mise en évidence de fluctuations saisonnières du fonctionnement rénal chez la Grenouille..... 22
F. Interprétation et discussion 22

Chapitre II. — Modalités et mécanismes de l'action antidiurétique de la vasotocine chez la Grenouille..... 25

A. Actions de l'arginine-vasotocine : description d'une expérience caractéristique 25
B. Actions de la lysine-vasotocine : analyse d'un exemple caractéristique. 27
C. Résultats d'ensemble..... 29
D. Résumé et discussion..... 36

Chapitre III. — Mécanisme des variations de la filtration glomérulaire produites par l'injection de vasotocine a la Grenouille..... 37

A. Principe de la méthode..... 37
B. Protocole expérimental..... 38
C. Résultats 38
D. Interprétation 41

Chapitre IV. — Comparaison des réponses des deux reins a une perfusion unilatérale de lysine-vasotocine dans une veine porte rénale..... 43

A. But et principe de la méthode..... 43
B. Protocole expérimental..... 44
C. Résultats 48
D. Interprétation et discussion 48

Chapitre V. — Action de douze analogues de la vasotocine sur l'excrétion de l'eau et des électrolytes par le rein de la Grenouille..... 50

A. Actions de l'ocytocine et de la lysine-vasopressine..... 50
B. Actions de l'isotocine et de la mésotocine 52
C. Action de huit analogues de structure de la vasotocine 55
D. Interprétation et discussion 55

Discussion et conclusion de la Première Partie 59

Deuxième Partie : Étude des premières étapes du mécanisme d'action de la vasotocine sur le rein de la Grenouille..... 67

Introduction 68

Chapitre Premier. — Mise en évidence de l'inhibition par l'ocytocine des actions tubulaires de la vasotocine sur le rein de la Grenouille..... 70

A. Protocole expérimental..... 70
B. Résultats 71
C. Interprétation et discussion 76

Chapitre II. — Principaux caractères de l'inhibition par l'ocytocine, des actions de la vasotocine sur le rein de la Grenouille..... 78

A. Position du problème 78

B. Relation entre l'intensité des actions tubulaires de la vasotocine et la dose d'hormone administrée 82
C. Réversibilité de l'inhibition par l'ocytocine des actions tubulaires de la vasotocine 87
D. Comparaison des actions maximales de la vasotocine mesurées en présence et en l'absence d'ocytocine 88
E. Relation entre l'intensité de l'inhibition et le rapport des masses d'ocytocine et de lysine-vasotocine administrées simultanément 91
F. Conclusions 95

CHAPITRE III. — ÉTUDE DES CORRÉLATIONS ENTRE LA STRUCTURE ET L'AFFINITÉ DE DIX ANALOGUES DE LA VASOTOCINE POUR LE RÉCEPTEUR TUBULAIRE DU REIN DE LA GRENOUILLE 96

A. Choix des analogues 96
B. Protocole expérimental 97
C. Résultats 98
D. Résumé et conclusions 103

CONCLUSION ET DISCUSSION DE LA DEUXIÈME PARTIE 106

CONCLUSION GÉNÉRALE 115

RÉSUMÉ 117

SUMMARY 118

BIBLIOGRAPHIE 119

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544321_0039

INTRODUCTION

Au cours des dix dernières années, notre connaissance du rôle physiologique et du mécanisme d'action des hormones neurohypophysaires s'est enrichie de données importantes et nouvelles apportées par des techniques expérimentales relativement différentes.

D'une part, le développement des méthodes analytiques et la mise en œuvre de procédés de dosage biologique nouveaux ont permis d'identifier, dans la neurohypophyse des Vertébrés inférieurs, des principes hormonaux différents de ceux des Mammifères. Les extraits neurohypophysaires des Amphibiens et de nombreuses espèces de Poissons téléostéens présentent en effet, sur les organes effecteurs propres à ces groupes, des propriétés pharmacologiques particulières dont ne peut rendre compte la seule présence d'ocytocine ou de vasopressine, hormones connues chez les Mammifères (Heller, 1941, 1950 ; Maetz et coll., 1959 *a*, *b*). Sawyer et coll. (1959) ont montré que l'arginine-vasotocine, chimère de l'ocytocine et de la vasopressine synthétisée par Katsoyannis et du Vigneaud (1958), présente des propriétés pharmacologiques comparables à celles des extraits neurohypophysaires des Vertébrés inférieurs. L'analyse chimique d'extraits de glande devait effectivement démontrer la présence de ce peptide dans la neurohypophyse de la Grenouille (Acher et coll., 1960), du Poulet (Chauvet et coll., 1960) et de plusieurs espèces de Poissons téléostéens (Acher et coll., 1961 ; Heller et Pickering, 1961 ; Rasmussen et Craig, 1961). Plus récemment, deux autres peptides neurohypophysaires nouveaux ont été découverts ; l'un, mis en évidence dans la neurohypophyse des Poissons (Heller et coll., 1961), a été identifié à la 4-sérine-8-isoleucine (isotocine) par Acher et coll. (1962), l'autre, la 8-isoleucine-ocytocine ou isotocine, a été isolée chez la Grenouille (Acher et coll., 1964). Plusieurs arguments de nature pharmacologique permettent, en outre, de conclure à l'existence dans la neurohypophyse des Vertébrés inférieurs et notamment de la Grenouille (Morel et coll., 1961) de peptides doués d'activité biologique et dont la structure n'a pas encore été définie.

D'autre part, l'étude de l'action des hormones neurohypophysaires sur la peau et la vessie des Amphibiens a permis, grâce aux commodités expérimentales qu'offrent ces préparations, de préciser les modalités de leurs actions sur les cellules épithéliales. Sur la peau et la vessie des Amphibiens, les hormones neurohypophysaires produisent un double effet : elles augmentent le coefficient de perméabilité osmotique pour l'eau (Ewer, 1952 ; Koefoed-Johnsen et Ussing, 1953 ; Bentley, 1958 ; Morel et coll., 1958) et stimulent l'absorption

active de sodium dont ces structures sont le siège (Fuhrman et Ussing, 1951 ; Leaf, 1960 ; Bourguet et Maetz, 1961).

Enfin, sous l'impulsion donnée par du Vigneaud, un nombre progressivement croissant d'analogues artificiels des hormones neurohypophysaires ont été synthétisés permettant ainsi d'aborder, pour la première fois dans le cas des hormones peptidiques, l'étude des corrélations liant la structure moléculaire et l'activité biologique.

Ce rappel bref et incomplet des progrès réalisés dans notre connaissance de la physiologie des hormones neurohypophysaires a pour but de préciser le contexte d'informations dans lequel nous nous sommes trouvés placés au cours du déroulement de ce travail. Nous avons choisi d'étudier les modalités et les mécanismes de l'action de l'arginine-vasotocine sur le rein de la Grenouille. Le choix de ce récepteur a été en grande partie dicté par l'intérêt que présentent l'étude de l'action des hormones neurohypophysaires sur un organe de structure plus simple que le rein des Mammifères et l'analyse de leur rôle physiologique dans l'osmorégulation chez un groupe qui occupe dans la série des Vertébrés une position écologique intermédiaire entre les formes primitives à l'habitat aquatique et les formes les plus évoluées à vie exclusivement terrestre. Cette étude, qui a été réalisée par la méthode des clearances comparées chez l'animal non anesthésié préparé de manière chronique et placé dans des conditions biologiques contrôlées, nous a permis de préciser certaines particularités du fonctionnement rénal chez la Grenouille. Par ailleurs, nous avons recherché sur ce récepteur les corrélations liant l'activité biologique et la structure chimique des hormones neurohypophysaires et de peptides artificiels, analogues de structure de l'arginine-vasotocine. Cette étude devait nous conduire à mettre en évidence la très grande spécificité du récepteur rénal chez la Grenouille. La situation expérimentale privilégiée ainsi réalisée nous a permis, en recherchant la nature et les mécanismes des interactions entre peptides de structure voisine, d'étudier de manière indirecte les premières étapes de leur mécanisme d'action considérées du point de vue des modalités de leur fixation sur un récepteur cellulaire spécifique.

Ainsi, deux aspects relativement différents du mécanisme d'action de l'arginine-vasotocine sur le rein de la Grenouille ont été abordés au cours de ce travail. L'un tend à définir la nature des modifications du fonctionnement des cellules tubulaires du rein, étudiées en rapport avec notre connaissance des actions des hormones neurohypophysaires sur le rein des Mammifères d'une part, et sur les structures épithéliales plus simples que sont la peau et la vessie des Amphibiens, d'autre part. L'autre conduit à la mise en évidence, sur une structure particulièrement favorable, d'un récepteur cellulaire spécifique présentant une très grande affinité pour la molécule hormonale.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Dans cette première partie de notre exposé, nous définissons les conditions biologiques dans lesquelles les effets de la vasotocine sur l'excrétion de l'eau et des électrolytes par le rein de la Grenouille, ont été recherchés. Puis, après avoir brièvement rappelé le principe de la méthode des clearances comparées et de son application à l'étude de l'excrétion minérale par le rein, nous décrivons les principales techniques mises en œuvre au cours de ce travail expérimental.

I. — Choix des conditions biologiques.

La mise en évidence du rôle physiologique d'une hormone en présence de la glande qui la sécrète est toujours difficile. Toutefois, dans le cas d'une hormone à action phasique assurant un rôle régulateur à court terme et dont le taux de sécrétion est directement ou indirectement contrôlé par la valeur instantanée de la grandeur régulée, le maintien de l'animal dans les conditions physiologiques pour lesquelles la concentration de l'hormone circulante est réduite à sa valeur minimum crée une situation expérimentale idéale pour l'étude de ses actions périphériques, sans qu'il soit nécessaire de recourir à une ablation préalable de la glande qui la produit. Ainsi, chez les Mammifères, il est bien établi qu'une surcharge en eau entraîne un tarissement de la sécrétion de l'hormone antidiurétique endogène, et c'est dans l'état de diurèse aqueuse qui en résulte que les actions de cette hormone peuvent être le plus commodément mises en évidence. Par analogie avec les résultats obtenus chez les Mammifères, et compte tenu des difficultés que présentent, chez la Grenouille, l'ablation de la neurohypophyse et *a fortiori* la destruction des noyaux hypothalamiques dans lesquels les hormones sont synthétisées, nous avons recherché l'action de la vasotocine sur le rein d'animaux non hypophysectomisés mais placés dans des conditions physiologiques d'hydratation maximum. D'ailleurs, l'hypophysectomie totale chez les Amphibiens conduit à des résultats divergents (voir par exemple Sawyer, 1956 et Maetz, 1963). Dans un petit nombre de cas, une augmentation importante du débit urinaire a été observée ; le plus souvent, aucune modification significative du fonctionnement rénal ne peut être mise en évidence. De même, des lésions plus spécifiques du système hypothalamo-neurohypophysaire, telles qu'elles ont été pratiquées par Barker-Jörgensen et coll. (1956), ne produisent aucune modification décelable du débit urinaire et de la perméabilité à l'eau de la peau.

En revanche, plusieurs arguments de nature indirecte indiquent que la déshydratation entraîne, chez les Amphibiens anoures, une libération accrue de vasotocine ; elle s'accompagne, en effet, d'une diminution importante du débit urinaire chez *Rana catesbiana* (Schmidt-Nielsen et Forster, 1954) et chez *Bufo marinus* (Sawyer, 1956), ainsi que d'une augmentation du flux net de réabsorption d'eau par la vessie (Sawyer et Schisgall, 1956). De plus, une diminution du contenu en hormone de la neurohypophyse est associée à la stimulation des organes effecteurs périphériques (Levinsky et Sawyer, 1953 ; Tramezzani et Uranga, 1954 ; Jancsó, 1955 ; Barker-Jörgensen et coll., 1956). Inversement, il est vraisemblable d'admettre qu'une hydratation importante entraîne une mise au repos physiologique de la neurohypophyse chez les Amphibiens à vie terrestre. Plongés dans l'eau, les Amphibiens anoures augmentent rapidement de poids par absorption d'eau par la peau (Brunn, 1921). Sans qu'il soit nécessaire de recourir à une surcharge en eau administrée par voie gastrique ou intraveineuse comme dans le cas des Mammifères, le maintien prolongé de la Grenouille dans de l'eau courante permet de placer l'animal dans les conditions physiologiques d'hydratation *a priori* les plus favorables pour l'étude des actions de la vasotocine sur le rein.

II. — Principe de la méthode des clearances comparées, et son application à l'étude de l'excrétion hydrominérale.

La méthode des clearances comparées, développée essentiellement par H. W. Smith et coll., permet de dresser de façon simple un bilan de l'activité du rein. Grâce à l'utilisation d'une substance de référence librement filtrée, non réabsorbée et non sécrétée au cours du cheminement de l'urine primitive le long des néphrons, il est en effet possible de mesurer le débit de filtration glomérulaire de cette substance et, en le rapportant à la concentration plasmatique déterminée au même moment, d'en déduire le volume d'ultrafiltrat plasmatique délivré aux tubules ; dès lors, la comparaison, pour chacun des constituants de l'urine, de la quantité finalement excrétée à la quantité filtrée permet d'établir le bilan des activités tubulaires. Cette technique repose, en définitive, sur la mesure simultanée du taux de filtration glomérulaire et de l'excrétion des principaux constituants de l'urine. Parmi les substances pouvant servir à la détermination du taux de filtration glomérulaire, l'inuline, polysaccharide de haut poids moléculaire, est la plus généralement utilisée. Chez les Amphibiens, comme chez les Mammifères, l'inuline est librement filtrée, sa concentration dans l'urine primitive est, en effet identique à la concentration plasmatique mesurée simultanément (Hendrix et coll., 1936) ; elle n'est ni réabsorbée, ni sécrétée par les cellules tubulaires (Richards et Walker, 1935 ; Forster, 1938). Le volume d'ultrafiltrat glomérulaire délivré aux tubules urinaires est donc mesuré par la clearance de l'inuline (C_{in}).

Appliquée à l'étude de l'excrétion hydrominérale, la méthode des clearances comparées permet une mesure commode de l'intensité de la réabsorption tubu-

laire de l'eau et des électrolytes. En premier lieu, la comparaison directe du débit urinaire et du taux de filtration glomérulaire permet de calculer aisément la fraction de l'eau filtrée qui est réabsorbée. Toutefois, l'étude de la réabsorption de l'eau est indissociable de celle de la réabsorption des solutes ; c'est en effet dans la mesure où il est capable de moduler indépendamment, sous l'influence de stimuli spécifiques, la quantité de solutes qu'il excrète et le volume d'eau qui les accompagne, que le rein joue un rôle important dans la régulation de la pression osmotique des liquides extracellulaires. L'excrétion des solutes par le rein est mesurée par la clearance osmotique. La clearance osmotique est définie par : $C_{osm} = U_{osm} \times V / P_{osm}$ dans laquelle $U_{osm} \times V$ produit du débit urinaire par la concentration osmotique de l'urine (U_{osm}) représente le débit osmotique urinaire. Le débit osmotique urinaire rapporté à la pression osmotique du plasma (P_{osm}) mesure le volume apparent d'une solution iso-osmotique au plasma que les reins épureraient totalement de ses solutes par unité de temps. La clearance osmotique relative : C_{osm}/C_{in} mesure la fraction de la quantité de solutes filtrés qui est finalement excrétée dans l'urine définitive. La différence entre le débit urinaire et la clearance osmotique : $V - C_{osm} = V (1 - U_{osm}/P_{osm})$ est appelée clearance de l'eau libre : C_{H_2O} ; elle représente la quantité d'eau pure qu'il faudrait ajouter ou retrancher d'une solution iso-osmotique au plasma pour obtenir en volume égal une solution de même pression osmotique que l'urine. La clearance de l'eau libre mesure le travail de concentration ou de dilution de l'urine par le rein. Lorsque l'urine est hypotonique, la clearance de l'eau libre est positive ; lorsque l'urine est hypertonique, la clearance de l'eau libre est négative. L'étude des variations de la clearance relative de l'eau libre permet de suivre l'évolution respective de la réabsorption tubulaire de l'eau et des solutes. Une baisse de la clearance relative de l'eau libre indique une réabsorption accrue d'eau par rapport à l'ensemble des solutes. De la même manière, la détermination des clearances et des clearances relatives du sodium et du potassium permet une mesure commode de l'excrétion et de l'intensité de la réabsorption des électrolytes par le rein.

Au cours de ce travail, la méthode des clearances comparées a été appliquée à l'étude des actions de la vasotocine sur le rein de la Grenouille dans le but de rechercher les effets éventuels de cette hormone sur les processus de réabsorption tubulaire de l'eau et des électrolytes.

III. — Techniques expérimentales.

Compte tenu de la relative diversité des abords expérimentaux mis en œuvre au cours de ce travail, nous ne présentons dans ce chapitre que les techniques communes à l'ensemble des expériences ; les interventions propres à chaque situation expérimentale particulière sont décrites chapitre par chapitre avant l'exposé des résultats.

A. Matériel biologique.

Les expériences décrites dans ce travail ont été réalisées sur des grenouilles *Rana esculenta*, L. mâles de 50 à 100 g de poids corporel provenant soit de Vendée, soit de la région grenobloise. Les animaux ont été conservés à jeun avec un libre accès à l'eau courante dans une pièce non chauffée du laboratoire, une semaine à un mois avant leur utilisation.

B. Préparation des animaux.

Une étude précise de l'excrétion hydrominérale et de ses variations rapides reste pratiquement irréalisable sans contrainte chez des animaux de petite taille comme la Grenouille ; en effet, dans les conditions normales, cet animal excrète de faibles quantités d'urine (de l'ordre ou inférieures à 2 ml par heure) émises après un séjour de durée variable dans la vessie qui est le siège d'une réabsorption importante d'eau (Ewer, 1952 ; Sawyer et Schisgall, 1956 ; Bentley, 1958) et d'électrolytes (Leaf, 1960 ; Bourguet et Maetz, 1961). Ces phénomènes constituent une limitation importante à l'étude de l'excrétion rénale proprement dite. De plus, l'expérimentation sur l'animal anesthésié telle qu'on peut la pratiquer chez les Mammifères est difficilement réalisable chez les Amphibiens ; en effet, l'anesthésie entraîne un arrêt de la respiration pulmonaire et buccopharyngée (la respiration cutanée assurant seule l'hématose) et s'accompagne d'une oligurie très marquée. Enfin, de telles conditions expérimentales sont difficilement compatibles avec le maintien des animaux dans un milieu liquide. Pour ces diverses raisons, nous avons été conduits à expérimenter sur des animaux non anesthésiés et préparés de manière chronique selon une méthode, analogue à celle décrite par Uranga et Sawyer (1960), dont nous exposons brièvement ci-dessous les principales étapes.

Anesthésie.

Les animaux sont anesthésiés par immersion pendant 10 mn dans une solution à 0,2 p. 100 de méthane-tricaïne-sulfonate (1). L'anesthésie ainsi obtenue est complète pendant 45 mn environ.

Préparation des uretères.

Les deux uretères sont mis à jour par l'incision de la peau et de la paroi musculaire le long de la ligne médiane dorsale sur une longueur de 1,5 cm environ en partant de l'extrémité postérieure de l'urostyle, puis dénudés sur la partie terminale de leur trajet avant leur ouverture dans le cloaque. Un cathéter souple de polyéthylène (diamètre externe 0,7 mm, longueur 20 cm) est alors introduit dans chacun d'eux jusqu'au contact du rein puis fixé par une ligature.

(1) M. S. 222 Sandoz.

Préparation d'une artère iliaque.

L'artère iliaque commune gauche est mise à jour par la même incision et dénudée près de son départ de l'aorte dorsale, puis un cathéter de polyéthylène (diamètre externe 0,7 mm, longueur 20 cm) rempli d'une solution d'héparine (Liquemine Roche, 5 000 unités par ml) et soigneusement obturé à son extrémité libre par un bouchon de verre y est introduit et maintenu en place par une ligature. Dans les jours suivant l'opération, nous avons vérifié qu'aucun signe d'ischémie de la patte postérieure gauche n'apparaît.

Les deux cathéters urétéraux et le cathéter artériel sont alors fixés par des ligatures sur l'extrémité de l'urostyle et la peau de la cuisse puis les incisions musculaires et cutanées sont soigneusement suturées.

Conservation des animaux après l'opération.

Dès la fin de l'opération, les animaux sont placés dans des boîtes individuelles alimentées en eau courante. Des perforations pratiquées dans les parois latérales assurent le passage des cathéters et permettent de maintenir le liquide à un niveau tel que la partie antérieure du corps de l'animal soit hors de l'eau. Les expériences ont été réalisées dans un délai de 1 à 3 jours après l'opération, sans manipulation préalable des animaux.

Ce mode de préparation permet, chez la Grenouille non anesthésiée et placée dans des conditions d'environnement contrôlées, de recueillir l'urine urétérale de manière continue et avec un espace mort réduit. De plus, les diverses interventions expérimentales : injections intravasculaires, prises de sang, peuvent être réalisées à distance, l'animal se trouvant ainsi soustrait à des stimuli extérieurs non spécifiques, susceptibles par eux-mêmes de modifier l'excrétion hydrominérale.

C. Protocole général des expériences.

Sélection des animaux.

Seuls les animaux dont le débit d'urine des deux reins est régulier et comparable, sont retenus. Au début de l'expérience, de l'inuline est administrée par injection intravasculaire à raison de 40 mg par 100 g de poids corporel à partir d'une solution à 10 p. 100 dans du sérum physiologique.

Recueil des échantillons d'urine.

Pendant toute la durée de l'expérience, les extrémités libres des deux cathéters urétéraux sont placés à environ 5 cm au-dessous du niveau de l'animal de manière à éviter toute stase dans les voies urinaires. Le débit d'urine de l'ensemble des deux reins est enregistré de la manière suivante : chaque goutte d'urine établit, en tombant entre deux électrodes de platine, un contact qui, par l'intermédiaire d'un relais, est utilisé comme signal d'entrée d'un intégrateur électroméca-

nique (Morel et Serrel, 1949 ; Morel, 1950) inscrivant, sur un papier se déroulant à vitesse constante, des traits de hauteur proportionnelle au temps séparant deux gouttes successives d'urine, c'est-à-dire inversement proportionnelle au débit urinaire. L'enregistrement ainsi obtenu permet de contrôler la régularité du débit urinaire ou d'étudier la cinétique de ses variations rapides. L'urine est finalement recueillie dans des tubes à hémolyse par échantillons successifs caractéristiques des différentes phases de l'expérience et dont le volume, compris entre 0,1 et 0,2 ml, est mesuré exactement en fin d'expérience par la pesée des tubes préalablement tarés. Dans tous les cas on a tenu compte, pour les collections d'urine, de l'espace mort introduit par le volume du cathéter et des voies urinaires estimé pour toutes les expériences à 3 gouttes, soit environ 0,05 ml.

Recueil des échantillons de sang.

A intervalles réguliers de 30, 45 ou 60 mn, suivant la durée totale de l'expérience, des échantillons de 0,2 ml de sang sont prélevés dans l'artère iliaque, centrifugés puis le plasma décanté.

Administration des hormones.

Les peptides neurohypophysaires sont administrés à l'animal soit par injection intravasculaire rapide, dans un volume de 0,05 à 0,2 ml d'une solution saline isotonique au plasma, soit par perfusion à l'aide d'une pompe à injection continue (débit compris entre 0,01 et 0,04 ml/mn). Les doses employées sont exprimées en poids (μg) de peptide pur.

D. Traitement des échantillons.

La pression osmotique, la concentration de l'inuline du sodium et du potassium ont été mesurées en fin d'expérience sur chaque échantillon d'urine et de plasma.

Pour la détermination de la concentration de l'inuline, nous avons utilisé la réaction à la diphénylamine après hydrolyse à chaud en milieu chlorhydrique (Rolf et coll., 1950).

Les concentrations respectives du sodium et du potassium ont été mesurées par spectrophotométrie de flamme après dilution appropriée. Les résultats ont été exprimés en milliéquivalents par litre (mEq/l).

La pression osmotique a été déterminée sur un volume de 0,05 ml par l'abaissement du point de congélation mesuré à l'aide d'un dispositif semi-automatique (Lucarain, 1962). Les résultats ont été exprimés en milliosmoles par litre (mOsm/l).

E. Mode de calcul des clearances.

Les clearances de l'inuline du sodium et du potassium, la clearance osmotique et la clearance de l'eau libre ont été calculées pour chaque période de collection des urines et exprimées en millilitres par heure et rapportées à 100 g de poids corporel

(ml/h/100 g). La pression osmotique, la concentration du sodium et du potassium dans le plasma ne variant pas de manière systématique au cours de l'expérience, nous avons utilisé, pour le calcul des clearances, la moyenne des concentrations mesurées sur chaque échantillon de plasma. Par contre, la concentration plasmatique de l'inuline injectée en dose unique au début de l'expérience décroit exponentiellement en fonction du temps. La clearance de l'inuline a été calculée en utilisant la valeur instantanée de la concentration de l'inuline dans le plasma correspondant au milieu de chaque période de collection des urines. Celle-ci a été déterminée graphiquement sur la droite obtenue en portant le logarithme de la concentration de l'inuline dans le plasma en fonction du temps. La durée des périodes de collection est suffisamment courte pour que l'erreur introduite par ce mode de calcul soit minime.

F. Produits utilisés.

Nomenclature.

Pour désigner les hormones neurohypophysaires naturelles et ceux de leurs analogues utilisés dans ce travail, nous avons utilisé la nomenclature proposée par Bodansky et du Vigneaud (1959), Konzett et Berde (1959), et Jošt et coll. (1961), selon laquelle les peptides neurohypophysaires et leurs analogues sont désignés par référence à une molécule mère (ocytocine, lysine- ou arginine-vasopressine) considérée comme un nonapeptide dont les acides aminés constituants sont numérotés de 1 à 9 en partant de la demi-cystine portant le groupement aminé terminal (position 1) jusqu'à l'acide aminé porteur du groupe carboxylique libre (position 9). Chaque molécule porte le nom de la molécule mère, les acides aminés substitués étant indiqués, soit par leur nom précédé d'un chiffre indiquant leur position, soit par leur abréviation affectée d'un indice numérique. Dans ce travail, nous avons utilisé l'ocytocine comme molécule mère ; ainsi la lysine-vasopressine sera la 3-phénylalanine-8-lysine-ocytocine ou Phe^3-Lys^8-ocytocine et l'arginine-vasotocine la 8-arginine-ocytocine ou Arg^8-ocytocine. Dans le cas où un acide aminé de la molécule a été supprimé, l'analogue obtenu est désigné par le nom de l'acide aminé manquant précédé du préfixe « dé » (exemple : 8-déleucine-ocytocine ou dé-Leu^8-ocytocine). Cette nomenclature a été utilisée de manière systématique dans les tableaux ; toutefois, par souci de clarté, nous avons préféré conserver dans l'exposé le nom d'origine des hormones neurohypophysaires naturelles des Mammifères et des Amphibiens.

Nature et origine (1).

Dans ce travail, nous avons utilisé les peptides suivants : l'arginine-vasotocine, l'ocytocine, la lysine-vasopressine, la 8-isoleucine-ocytocine (mésotocine), la

(1) Qu'il nous soit permis de remercier ici le Pr V. du Vigneaud, qui nous a fourni l'arginine-vasotocine, la déamino-ocytocine et la 3-phénylalanine-ocytocine, le Docteur R. A. Boissonnas, pour l'envoi de 8-lysine-ocytocine, 3-valine-ocytocine, 3-leucine-ocytocine, 8-isoleucine-ocytocine, 4-sérine-8-isoleucine-ocytocine, 5-glutamine-ocytocine, 2-3-phénylalanine-8-lysine-ocytocine, 8-dé-leucine-ocytocine et de 7-dé-proline-ocytocine et les établissements Sandoz et Ferring respectivement pour l'envoi d'ocytocine (Syntocinon) et de lysine-vasopressine (Postacton).

4-sérine-8-isoleucine-ocytocine (isotocine), la 8-lysine-ocytocine (lysine-vasotocine), la déamino-ocytocine ou 1-acide-β-mercaptopropionique-ocytocine, la 3-leucine-ocytocine, la 3-valine-ocytocine, la 3-phénylalanine-ocytocine, la 2-phénylalanine-3-phénylalanine-8-lysine-ocytocine, la 5-glutamine-ocytocine, la 8-dé-leucine-ocytocine, et la 7-dé-proline-ocytocine. Tous ces produits ont été obtenus par synthèse à l'exception de la lysine-vasopressine qui est un produit d'extraction. Le lecteur trouvera rappelée dans le tableau XXVII p. 112 la structure primaire de l'ensemble de ces peptides.

Conditionnement et conservation.

Dès leur arrivée au laboratoire, les hormones et leurs analogues ont été placés dans des ampoules stériles scellées contenant environ 20 µg de peptide pur en solution aqueuse et conservés au réfrigérateur. Les solutions de conservation ont la composition suivante : phénol 0,5 p. 100, acide acétique 0,5 p. 100, chlorure de sodium 0,9 p. 100 pour la lysine-vasopressine, acide acétique 0,5 p. 100, chlorure de sodium 0,9 p. 100 pour l'arginine-vasotocine et la 3-phénylalanine-ocytocine, chlorobutanol 0,5 p. 100, alcool éthylique 0,5 p. 100 et chlorure de sodium 0,9 p. 100 pour les autres substances.

Les ampoules sont ouvertes au moment de l'emploi et les produits utilisés après dilution appropriée dans du liquide de Ringer. Les doses d'hormone injectées sont suffisamment faibles et les solutions mère de peptides suffisamment concentrées pour que les quantités de solvant administrées à l'animal soient dans tous les cas négligeables.

Le contrôle des conditions de conservation de ces peptides a été assuré périodiquement au cours du déroulement de ce travail par la mesure de leur activité biologique : activité ocytocique ou vasopressique selon les cas. L'activité vasopressique a été déterminée chez le Rat anesthésié et vagotomisé par une méthode inspirée de celle décrite par Landgrebe et coll. (1946). La pression artérielle a été mesurée dans l'artère carotide par l'intermédiaire d'une jauge de contrainte reliée à un millivoltmètre enregistreur. Les injections hormonales ont été effectuées dans une veine jugulaire et le dosage réalisé en utilisant l'étalon standard international comme substance de référence (une unité internationale étant définie comme l'activité biologique contenue dans 0,5 mg de poudre). L'activité ocytocique a été déterminée en utilisant comme méthode de dosage biologique la baisse transitoire de la pression artérielle produite chez les Oiseaux par l'injection intraveineuse d'ocytocine (« avian depressor test »). Une méthode analogue à celle décrite dans la « British Pharmacopeia » (1958), a été utilisée : la pression artérielle a été mesurée dans une artère carotide chez la Poule anesthésiée, les injections hormonales ont été effectuées dans une veine jugulaire externe et l'étalon standard international a été utilisé comme substance de référence.

Pour l'ensemble de ces peptides aucune inactivation importante n'a été mise en évidence.

PREMIÈRE PARTIE

ACTIONS DE LA VASOTOCINE ET DE DOUZE DE SES ANALOGUES SUR L'EXCRÉTION DE L'EAU ET DES ÉLECTROLYTES PAR LE REIN DE LA GRENOUILLE

Cette partie de notre exposé est consacrée à l'étude de l'action de la vasotocine et de 12 de ses analogues de structure sur l'excrétion de l'eau et des électrolytes par le rein de la Grenouille. Après avoir brièvement rappelé les caractéristiques principales de l'excrétion hydrominérale étudiée dans les conditions expérimentales définies ci-dessus, nous décrivons les actions de la vasotocine sur le taux de filtration glomérulaire et l'intensité de la réabsorption tubulaire de l'eau, du sodium, du potassium et de l'ensemble des solutés. Puis nous tentons, par un abord expérimental différent, de définir les mécanismes des variations de la filtration glomérulaire produites par la vasotocine et de localiser le long du néphron le site des actions tubulaires de l'hormone. Nous décrivons, enfin, les actions des autres peptides neurohypophysaires naturels : l'ocytocine, la vasopressine, la mésotocine et l'isotocine ainsi que celles de 8 nonapeptides de synthèse, analogues de structure de ces hormones.

CHAPITRE PREMIER

CARACTÉRISTIQUES DE L'EXCRÉTION HYDROMINÉRALE CHEZ LA GRENOUILLE HYDRATÉE

Après un bref rappel de l'anatomie du rein de la Grenouille dont la connaissance sera indispensable à la compréhension d'une partie des résultats présentés ultérieurement, nous décrivons dans ce chapitre les caractéristiques essentielles de l'excrétion hydrominérale chez la Grenouille placée dans des conditions physiologiques d'hydratation maximum.

A. Anatomie et organisation structurale du rein de la Grenouille.

Chez les Amphibiens anoures comme la Grenouille, le rein est allongé et aplati ; il repose par une de ses faces sur les muscles vertébraux, l'autre face étant appliquée contre le péritoine. La fig. 1 empruntée à VON MOELLENDORF (1930), illustre sur une coupe schématique du rein de la Grenouille la morphologie des néphrons, leur disposition à l'intérieur du rein, et les principaux détails de leur vascularisation.

Les néphrons comprennent les segments suivants : le glomérule, un collet court et cilié, un segment à bordure en brosse ou tubule proximal, un court segment formé de cellules aplaties et flagellées, et un segment distal s'ouvrant dans des canaux collecteurs.

Dans le rein, les glomérules se répartissent sur un plan parallèle à l'axe longitudinal. De là, part en direction dorsale, le collet auquel fait suite le tube proximal ; après avoir atteint la surface dorsale du rein, celui-ci se recourbe ventralement, dessinant une courbe. Vers la partie médiane se situe le segment grêle flagellé et le tube distal dont les circonvolutions occupent la partie ventrale du rein. Ainsi, dans ce groupe, les segments proximaux et distaux des néphrons se trouvent séparés spatialement, les premiers occupant les deux tiers dorsaux et les seconds le tiers ventral du rein.

La vascularisation du rein des Amphibiens présente un caractère particulier important : l'existence d'un système porte rénal. La veine porte rénale, issue de la veine iliaque commune, se résout dans la partie dorsale du rein en un réseau important de capillaires irriguant les tubules contournés proximaux. Les tubules distaux, par contre, sont, à l'exception de leur partie terminale, essentiellement

irrigués par les capillaires issus des artérioles postglomérulaires. Les deux réseaux de capillaires confluent dans leurs parties terminales pour donner naissance à la veine rénale efférente.

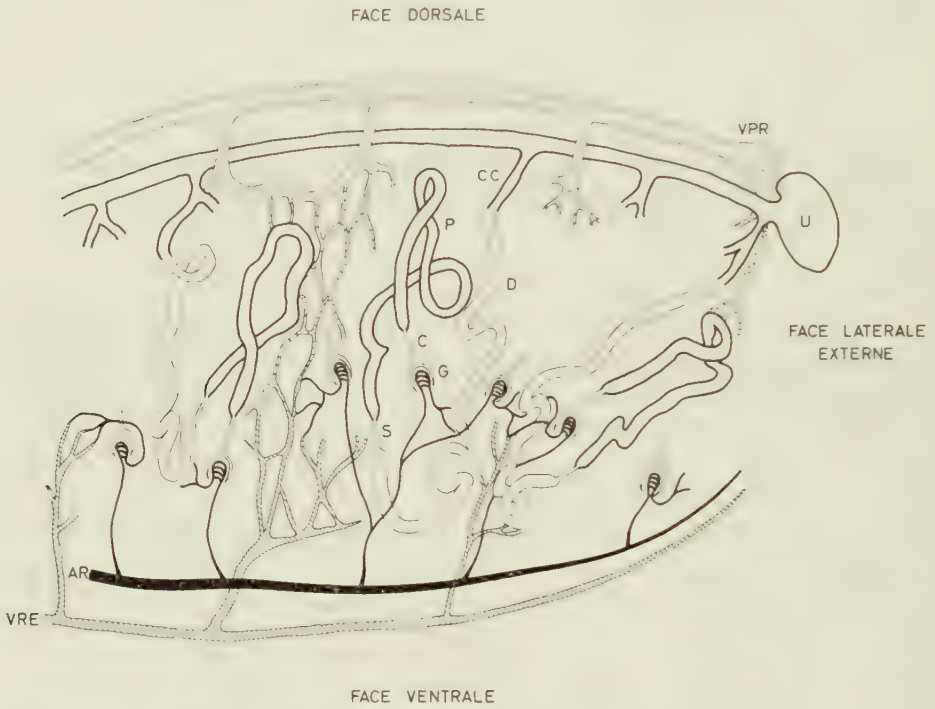


Fig. 1. — Organisation structurale du rein de la Grenouille.
Coupe transversale schématique d'un rein de Grenouille, montrant :
1° les différents segments constitutifs du néphron (glomérule : G ; collet : C ; tube contourné proximal : P ; segment flagellé : S ; tube concourné distal : D ; canal collecteur : C.C.) et leur localisation à l'intérieur du rein ;
2° la localisation des principaux vaisseaux sanguins (artère rénale : AR ; veine porte rénale VPR ; veine rénale efférente : VRE) et de l'uretère : U ;
3° l'irrigation des tubules contournés distaux par les artérioles postglomérulaires, et des tubes contournés proximaux par les capillaires issus de la veine porte rénale (d'après von Moellendorf, 1930).

B. Le débit urinaire et la filtration glomérulaire.

Le tableau I donne les valeurs moyennes du débit urinaire et de la filtration glomérulaire mesurés chez 115 animaux. Pour l'établissement des moyennes, nous n'avons retenu que les valeurs mesurées au début de chaque expérience avant toute injection hormonale.

La valeur moyenne du débit urinaire de 2,72 ml h⁻¹ 100 g indique que, dans ces conditions expérimentales, la Grenouille émet une urine abondante, le débit atteint est du même ordre de grandeur que celui du Rat en état de diurèse aqueuse (voir par exemple, Morel, 1955).

Le volume d'urine excrétée représente une large fraction (environ 50 p. 100) de l'ultrafiltrat glomérulaire délivré aux tubules ; la valeur moyenne de la clearance de l'inuline n'est que de 4,68 ml/h/100 g, soit à poids égal plus de 10 fois inférieure aux valeurs mesurées chez les Mammifères de petite taille comme le Rat (voir SMITH, 1951).

TABLEAU I. — *Débit urinaire et filtration glomérulaire chez la Grenouille hydratée.*

	Nombre de mesures	Moyenne	Intervalle de confiance	Valeurs extrêmes
Débit urinaire (ml/h/100 g)	115	2,72	± 0,24	0,9 – 7,8
Filtration glomérulaire (ml/h/100 g)	115	4,68	± 0,57	1,1 – 19

L'intervalle de confiance a été calculé selon SNEDECOR (1937) par : i.c. = $\pm t_{0,05} \times s/\sqrt{n}$ où s représente la variance, n le nombre de mesures et $t_{0,05}$ la valeur du coefficient de « Student » au seuil de probabilité de 0,05 et pour $(n - 1)$ degrés de liberté

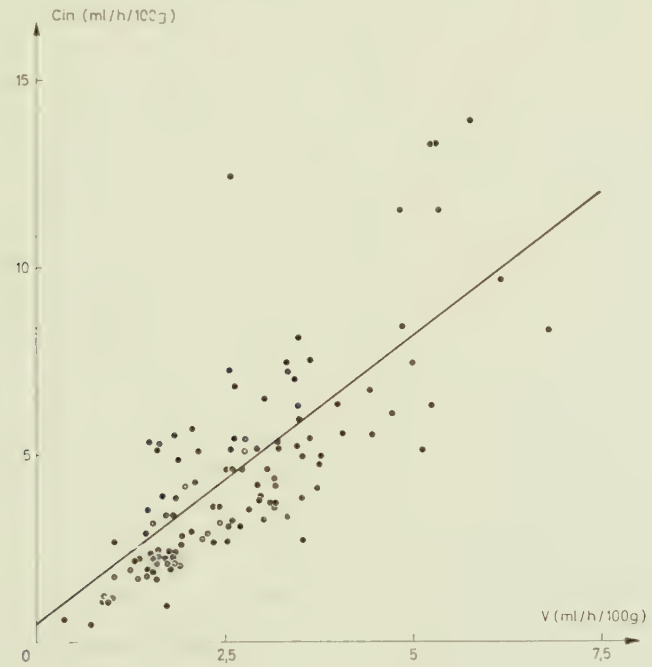


FIG. 2. — Corrélation entre le débit urinaire et la filtration glomérulaire.
En abscisses : le débit urinaire : V (ml/h/100 g), ; en ordonnées : la clearance de l'inuline : C_{in} (ml/h/100 g).
Coefficient de corrélation : $r = 0,704$ ($P < 0,001$).
Équation de la droite de régression linéaire calculée par la méthode des moindres carrés : $C_{in} = 1,54\ V + 0,51$.

Comme l'indiquent les valeurs extrêmes portées sur le tableau, le débit urinaire et la filtration glomérulaire varient dans de larges limites d'un animal à l'autre ; pour l'ensemble des mesures effectuées, une corrélation très significative ($r = 0{,}704$, $P < 0{,}001$) lie ces deux grandeurs. L'existence d'une relation linéaire entre la clearance de l'inuline et le débit urinaire (voir fig. 2) indique que, quelle que soit l'intensité de la filtration glomérulaire, une fraction sensiblement constante du volume d'ultrafiltrat plasmatique délivré aux tubules est réabsorbée au cours du cheminement de l'urine primitive le long des néphrons.

C. Pression osmotique de l'urine, clearance osmotique et clearance de l'eau libre.

Le tableau II donne les valeurs moyennes de la pression osmotique du plasma et de l'urine, de la clearance osmotique, de la clearance de l'eau libre et des clearances relatives correspondantes mesurées chez les mêmes animaux.

TABLEAU II. — *Excrétion de l'eau et des électrolytes par le rein de la Grenouille hydratée.*

	Nombre de mesures	Moyenne	Intervalle de confiance
P_{osm} (mOsm/l)	115	191	± 22
U_{osm} (mOsm/l)	115	25	± 2
C_{osm} (ml/h/100 g)	115	0,46	± 0,08
C_{osm}/C_{in}	115	0,089	± 0,010
C_{H_2O} (ml/h/100 g)	115	2,27	± 0,21
C_{H_2O}/C_{in}	115	0,566	± 0,032

P_{osm} et U_{osm} : pression osmotique du plasma et de l'urine.
C_{osm} : clearance osmotique, C_{osm}/C_{in} : clearance osmotique relative
C_{H_2O} : clearance de l'eau libre, C_{H_2O}/C_{in} : clearance relative.
L'intervalle de confiance a été calculé au seuil de probabilité de 0,05.

Les valeurs obtenues montrent le grand pouvoir de dilution de l'urine par le rein de la Grenouille hydratée. La pression osmotique de l'urine définitive (25 mOsm/l) est près de 10 fois inférieure à la pression osmotique du plasma. Comparée au débit urinaire, la clearance osmotique, qui représente le volume apparent de plasma qui serait complètement épuré de ses solutes par unité de temps, est très faible.

La valeur moyenne de la clearance osmotique relative (0,089) indique que 90 p. 100 environ de la masse de solutés filtrés est réabsorbée par les cellules tubulaires. La clearance de l'eau libre a une valeur très voisine du débit urinaire, la clearance relative moyenne de l'eau libre de 0,566 indique que plus de la moitié du volume de l'ultrafiltrat glomérulaire se retrouve dans l'urine définitive sous forme d'eau libre. Enfin, aucune corrélation entre la pression osmotique de l'urine définitive et l'intensité de la filtration glomérulaire n'a pu être mise en évidence ($r = 0{,}119$, $P > 0{,}1$).

D. Excrétion du sodium et du potassium.

Dans le tableau III, nous indiquons les valeurs moyennes de la concentration du sodium et du potassium dans le plasma et dans l'urine ainsi que des clearances et des clearances relatives de ces deux ions.

TABLEAU III. — *Excrétion du sodium et du potassium par le rein de la Grenouille.*

	Nombre de mesures	Moyenne	Intervalle de confiance
P_{Na} (mEq/l)	115	91,7	± 15,2
P_K (mEq/l)	115	4,0	± 0,6
U_{Na} (mEq/l)	113	5,7	± 0,9
U_K (mEq/l)	110	0,8	± 0,1
C_{Na} (ml/h/100 g)	113	0,18	± 0,04
C_K (ml/h/100 g)	110	0,53	± 0,12
C_{Na}/C_{in}	113	0,040	± 0,007
C_K/C_{in}	110	0,13	± 0,02

P_{Na} et P_K, concentrations du sodium et du potassium dans le plasma, U_{Na} et U_K, concentrations dans l'urine. C_{Na} et C_K, clearances du sodium et du potassium. C_{Na}/C_{in} et C_K/C_{in}, clearances relatives correspondantes. Les intervalles de confiance ont été calculés au seuil de probabilité de 0,05.

L'examen de ce tableau montre que les concentrations du sodium et du potassium dans l'urine sont très inférieures à leurs valeurs mesurées dans le plasma. Les valeurs faibles de leurs clearances et clearances relatives respectives indiquent qu'une fraction importante de la quantité filtrée est réabsorbée par les cellules

tubulaires (96 p. 100 dans le cas du sodium et 87 p. 100 dans le cas du potassium). Compte tenu des variations importantes du taux de filtration glomérulaire observées d'un animal à l'autre, la quantité absolue de sodium ou de potassium réabsorbée varie dans de larges limites ; cependant, il n'existe aucune corrélation significative entre la concentration finale atteinte dans l'urine et l'intensité de la filtration glomérulaire (coefficients de corrélation $r = 0{,}131$, $P > 0{,}1$, $r = 0{,}028$, $P > 0{,}1$ dans le cas du sodium et du potassium respectivement). Si l'on admet que les électrolytes se trouvent dans l'urine sous la forme de sels entièrement dissociés d'un anion monovalent, ils ne représentent que la moitié environ de la pression osmotique totale de l'urine ; l'urée qui, chez les Amphibiens Anoures, est activement sécrétée par les cellules tubulaires (MARSHALL, 1932) rend vraisemblablement compte d'une partie importante de la pression osmotique résiduelle. Signalons, enfin, que la concentration du sodium dans l'urine urétérale de la Grenouille est significativement plus élevée que la concentration mesurée dans l'urine vésicale d'animaux de la même espèce placés dans des conditions d'hydratation comparables où elle est de l'ordre de 1 mEq l ; cette différence traduit une réabsorption importante de sodium par la vessie.

E. Mise en évidence de fluctuations saisonnières du fonctionnement rénal chez la Grenouille.

Le nombre important de nos expériences et leur répartition sensiblement régulière au long de l'année nous ont permis de rechercher d'éventuelles fluctuations saisonnières de l'excrétion hydrominérale chez la Grenouille. Nous avons arbitrairement réparti nos données expérimentales en plusieurs groupes correspondant chacun aux expériences effectuées pendant un mois donné de l'année et soumis l'ensemble de nos informations à une analyse de variance (Voir SNEDECOR, 1937). Les valeurs trop peu nombreuses obtenues au cours des mois de mars, d'août et de septembre ont été exclues de cette étude. Les résultats de l'analyse statistique, résumés et illustrés sur la figure 3, montrent que le débit urinaire, la clearance osmotique et les clearances de l'eau libre du sodium et du potassium restent sensiblement constants tout au long de l'année, alors que pendant les mois d'avril et de mai la filtration glomérulaire est plus élevée et la réabsorption tubulaire d'eau et de solutes plus intense que pendant l'ensemble des autres mois de l'année ; en effet, pendant cette période, la clearance de l'inuline est significativement augmentée et les clearances relatives C_{osm}/C_{in}, C_{H_2O}/C_{in}, C_{NA}/C_{in} et C_K/C_{in} significativement diminuées. Des fluctuations saisonnières de la filtration glomérulaire analogues à celles que nous décrivons ont été observées par FORSTER (1943) chez *Rana catesbiana*.

F. Interprétation et discussion.

Les résultats présentés dans ce chapitre montrent que la Grenouille maintenue dans l'eau courante excrète une urine abondante et très diluée ; au cours du cheminement de l'urine primitive le long des néphrons, 91 p. 100 de l'ensemble des

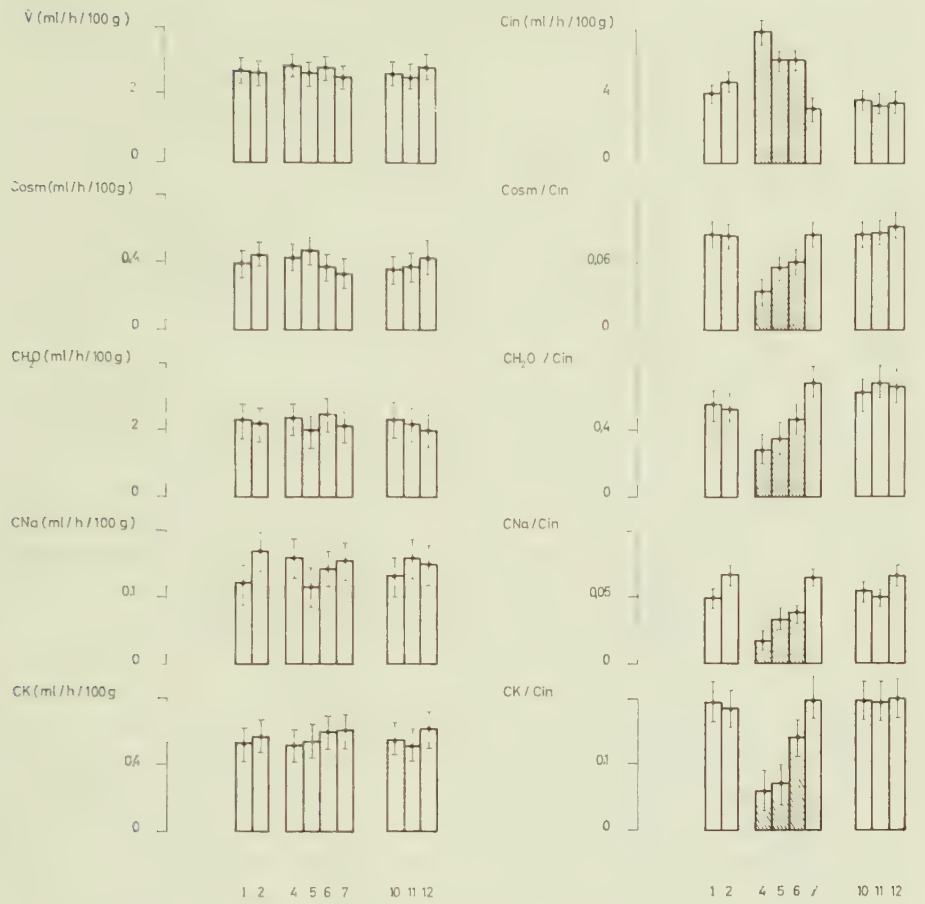


FIG. 3. — Fluctuations saisonnières de l'excrétion hydrominérale par le rein de la Grenouille.

Chaque colonne indique la valeur moyenne du débit urinaire (V) de la clearance de l'inuline (C_{in}), de la clearance osmotique (C_{osm}) des clearances de l'eau libre (C_{H_2O}) du sodium (C_{Na}), du potassium (C_K) et des clearances relatives correspondantes (C_{osm}/C_{in}, C_{H_2O}/C_{in}, C_{Na}/C_{in} et C_K/C_{in}) calculées pour plusieurs groupes de mesures correspondant chacun aux expériences effectuées pendant un mois donné de l'année (1 à 12). Les traits verticaux indiquent la plus petite différence significative entre les valeurs moyennes des différents groupes calculée au seuil de probabilité de 0,05 (selon SNEDECOR, 1937), par $D = Q \times Sx$ où Sx représente l'erreur standard sur la moyenne des valeurs de l'ensemble des groupes et Q un coefficient défini dans une table en fonction du seuil de probabilité choisi, du nombre de groupes et du degré de liberté d.l. = (n-N-2) où n est le nombre total des mesures et N le nombre de groupes. Commentaires dans le texte.

solutes, 96 p. 100 du sodium et 87 p. 100 du potassium délivrés aux tubules urinaires par l'ultrafiltrat glomérulaire sont réabsorbés, alors que plus de la moitié de l'eau filtrée se retrouve dans l'urine définitive sous forme d'eau libre. Comme WALKER et coll. (1937) l'ont montré par l'analyse directe du fluide intratubulaire, l'urine primitive reste iso-osmotique au plasma tout au long du tube proximal

chez la Grenouille ; l'émission d'une urine finale aussi diluée implique donc l'existence d'une réabsorption importante de solutes et, en particulier, de sodium, dans un segment distal des néphrons pratiquement imperméable à l'eau.

L'analyse des résultats obtenus sur un grand nombre d'animaux montre que la composition de l'urine définitive est relativement indépendante de l'intensité de la filtration glomérulaire, susceptible par ailleurs de fluctuations individuelles très marquées. Il n'existe, en effet, aucune corrélation significative entre la clearance de l'inuline et la concentration du sodium, du potassium, ou la pression osmotique de l'urine, alors que le débit urinaire est une fonction linéaire de l'intensité de la filtration glomérulaire. Les variations très importantes de l'intensité de la réabsorption tubulaire des principaux constituants de l'urine primitive, que dénotent ces observations, sont difficilement concevables sans admettre que la masse de tissu tubulaire actif varie proportionnellement au taux de filtration glomérulaire. Comme le suggérait Forster (1942), des modifications de la filtration glomérulaire qui résulteraient non pas d'une variation de la pression de filtration pour l'ensemble des néphrons, mais d'une modification du nombre de glomérules fonctionnels dont une partie seulement se trouverait simultanément en activité, permettraient de rendre compte de ces observations de façon simple. Des arguments expérimentaux directs en faveur d'une telle interprétation seront présentés dans un chapitre ultérieur de notre exposé.

Enfin, il est remarquable de constater que les fluctuations saisonnières du fonctionnement rénal mises en évidence au cours de ce travail — augmentation de l'intensité de la filtration glomérulaire et des processus de réabsorption tubulaire — n'affectent, en définitive, ni la composition ni le débit de l'urine émise par le rein. Le déterminisme de ces fluctuations n'a pas été recherché dans le cadre de ce travail ; toutefois, il est vraisemblable que l'augmentation générale du métabolisme qui suit le repos hivernal chez les Amphibiens permet à elle seule d'en rendre compte. Par ailleurs, dans la mesure où elles ne modifient ni qualitativement ni quantitativement, les réponses du rein à l'administration de vasotocine, il n'en sera pas tenu compte dans la suite de notre exposé.

Au vu des résultats présentés dans ce chapitre, il apparait vraisemblable que le maintien prolongé de la Grenouille dans l'eau, en créant des conditions physiologiques d'hydratation maximum, entraine un tarissement de la sécrétion de vasotocine endogène que traduirait l'émission par le rein d'une urine abondante et diluée. Ces conditions expérimentales sont donc *a priori* très favorables à l'étude des actions de l'hormone dont le rôle physiologique présumé est de limiter les pertes rénales d'eau et d'électrolytes et de stimuler l'absorption d'eau et de sodium par la peau et la vessie. La mise en évidence de modifications importantes de l'excrétion hydrominérale, sous l'action de très faibles doses de vasotocine administrées à la Grenouille ainsi préparée, et que nous décrivons dans les chapitres suivants, reste au demeurant le meilleur argument en faveur d'une telle interprétation.

CHAPITRE II

MODALITÉS ET MÉCANISMES DE L'ACTION ANTIDIURÉTIQUE DE LA VASOTOCINE CHEZ LA GRENOUILLE

Dans ce chapitre, nous décrivons les modifications de l'excrétion hydrominérale produites par l'injection à la Grenouille d'arginine-vasotocine, hormone naturelle, ou de 8-lysine-ocytocine (lysine-vasotocine), analogue de synthèse de structure très voisine.

A. Actions de l'arginine-vasotocine : description d'une expérience caractéristique.

Le tableau IV et les figures 4 et 5 illustrent sur un exemple caractéristique les modalités de l'action de l'arginine-vasotocine sur l'excrétion de l'eau et des électrolytes par le rein d'une Grenouille préparée de manière chronique et maintenue dans l'eau courante depuis la fin de l'opération. Au cours de l'expérience, conduite selon le protocole général décrit précédemment, une faible dose d'arginine-vasotocine en solution dans du liquide de Ringer a été administrée par injection continue dans l'artère iliaque à raison de 0,0004 µg par mn pendant 40 mn (débit de perfusion : 0,025 ml/mn).

La figure 4 montre que l'arginine-vasotocine produit un effet antidiurétique marqué qui se développe complètement entre la 5e et la 10e mn suivant le début de l'injection. Le débit urinaire se maintient à une valeur faible et sensiblement constante pendant toute la durée de la perfusion, puis augmente rapidement dès la fin de celle-ci pour atteindre, dans les 20 mn qui suivent, une valeur d'équilibre voisine de celle mesurée au début de l'expérience. Dans nos conditions expérimentales, le débit urinaire est la seule grandeur dont les variations peuvent être commodément étudiées de manière continue. Les modifications de la composition de l'urine associées à l'action antidiurétique de la vasotocine ont été recherchées en mesurant la pression osmotique et la concentration de l'inuline, du sodium et du potassium, dans une série de 5 échantillons d'urine caractéristiques des différentes phases de l'expérience (voir fig. 4). Les deux premiers (U_1 et U_2), sont des échantillons témoins collectés avant l'injection d'hormone, l'échantillon U_3 a été recueilli pendant la période d'antidiurèse maximale et les échantillons U_4 et U_5 pendant la phase d'augmentation rapide du débit urinaire et la première période témoin suivant la fin de l'action.

Comme le montrent le tableau IV et la figure 5, l'injection de vasotocine produit une faible diminution de la filtration glomérulaire (baisse de la clearance de l'inuline) et entraine des modifications importantes de la composition de l'urine émise par le rein dont la pression osmotique et la concentration en inuline et en potassium s'élèvent alors que la concentration en sodium est abaissée.

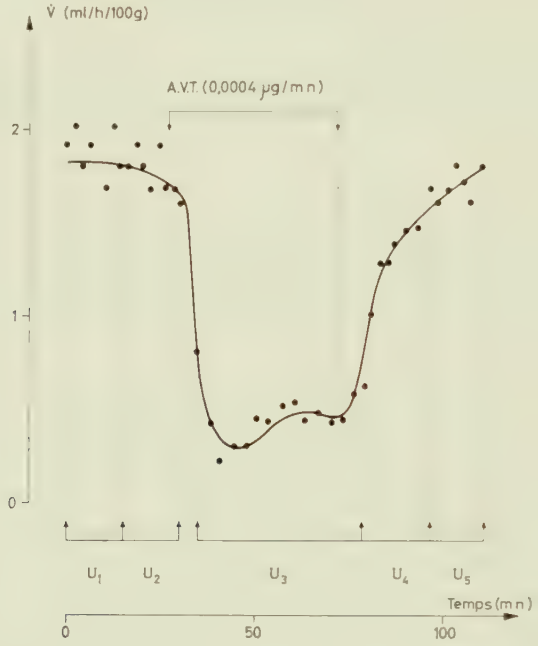


Fig. 4. — Action antidiurétique de l'arginine-vasotocine chez la Grenouille.
Expérience du 7-7-1961. Grenouille : poids 60 g. Opérée le 5-6-1961.
En abscisses : le temps en minutes. En ordonnées : le débit d'urine (V) de l'ensemble des deux reins. Les flèches indiquent le début et la fin d'une perfusion de 0,0004 µg/mn d'arginine-vasotocine (A.V.T.). Au bas de la figure, sont indiqués les temps de début et de fin de collection des 5 échantillons d'urine (U_1 à U_5) recueillis au cours de l'expérience.
On remarquera l'effet antidiurétique marqué de l'arginine-vasotocine et sa rapide réversibilité dès la fin de la perfusion d'hormone.

L'augmentation de la pression osmotique et des concentrations de l'inuline et du potassium dans l'urine indique que la diminution du débit urinaire résulte essentiellement d'une augmentation de la réabsorption tubulaire d'eau libre. La clearance de l'eau libre est considérablement diminuée même lorsqu'elle est rapportée à la clearance de l'inuline (baisse de la clearance relative C_{H_2O}/C_{in}). La faible diminution de l'excrétion des solutes et du potassium (baisse de la clearance osmotique et de la clearance du potassium) résulte entièrement de la baisse du taux de filtration glomérulaire ; en effet, au maximum de l'effet antidiurétique, les clearances relatives C_{osm}/C_{in} et C_K/C_{in} ne sont pas modifiées. En revanche, la diminution de la concentration du sodium dans l'urine définitive, la baisse marquée de sa clearance et de sa clearance relative montrent que sous l'action de l'hormone, la réabsorption tubulaire de sodium est augmentée.

En résumé, la vasotocine diminue la filtration glomérulaire et stimule la réabsorption tubulaire d'eau libre et de sodium. Cette double action rend compte d'un effet antidiurétique marqué et d'une diminution très importante de l'excrétion rénale de sodium.

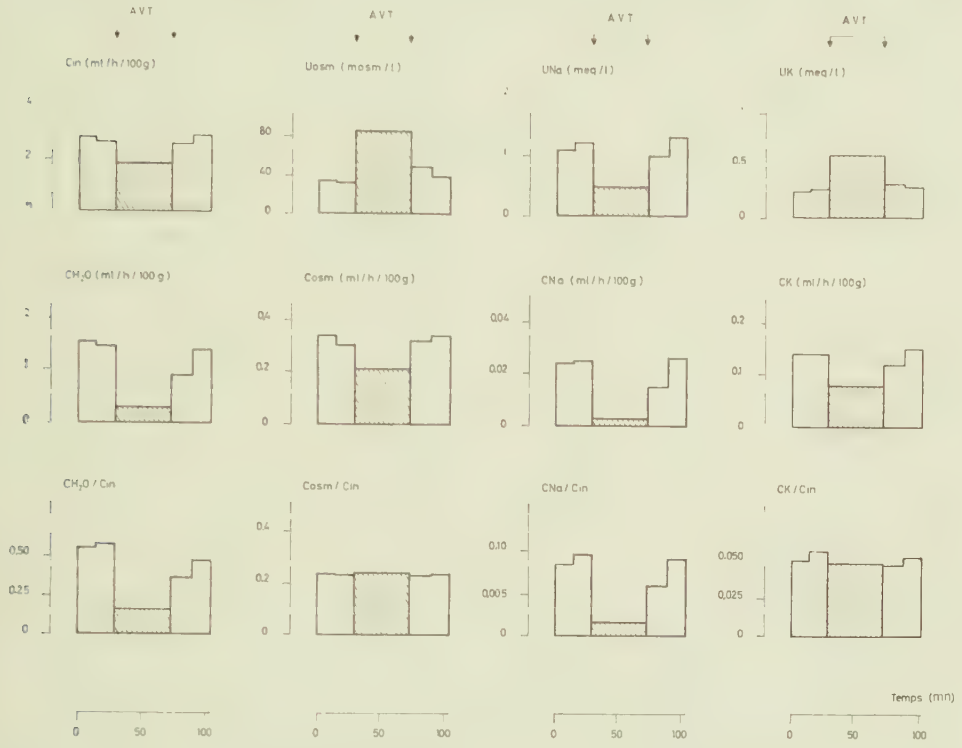


Fig. 5. — Actions de l'arginine-vasotocine sur la filtration glomérulaire et la réabsorption tubulaire d'eau libre, de solutes, de sodium et de potassium.

Expérience du 7-6-1961 (*suite*). Le graphique construit à partir des valeurs du tableau IV montre l'évolution en fonction du temps, de la filtration glomérulaire de la pression osmotique de l'urine, des concentrations urinaires du sodium et du potassium, des clearances et clearances relatives de l'eau libre du sodium et du potassium, de la clearance osmotique et de la clearance osmotique relative au cours d'une perfusion d'arginine-vasotocine indiquée par les flèches.

Les différentes colonnes correspondent aux échantillons d'urine (U_1 à U_5) définis précédemment (voir fig. 4), les zones hachurées indiquent la phase d'antidiurèse maximale.

Abréviations : voir tableau IV. Commentaires dans le texte.

B. Actions de la lysine-vasotocine : analyse d'un exemple caractéristique.

Les figures 6 et 7 montrent, sur un exemple caractéristique, qu'une faible dose de lysine-vasotocine produit dans des conditions expérimentales analogues un effet antidiurétique et une diminution de l'excrétion rénale de sodium comparables dans leurs modalités et leurs mécanismes aux actions de l'hormone naturelle. Comme l'arginine-vasotocine, la lysine-vasotocine produit un effet anti-

TABLEAU IV. — *Modifications de la composition de l'urine au cours de l'effet antidiurétique de l'arginine-vasotocine.*

Échantillon	U_1 (témoin)	U_2 (témoin)	U_3 antidiurèse maximale	U_4 fin de l'action	U_5 (témoin)
Durée (mn)	15	15	44	18	14
V (ml/h)	1,88	1,76	0,48	1,26	1,70
U_{in}/P_{in}	1,50	1,48	3,71	2,06	1,70
U_{osm}	34	32	84	48	38
U_{Na} (mEq/l)	1,09	1,22	0,48	1,00	1,31
U_K (mEq/l)	0,25	0,28	0,60	0,33	0,30
C_{in} (ml/h)	2,82	2,60	1,78	2,60	2,90
C_{osm} (ml/h)	0,34	0,30	0,21	0,32	0,34
C_{H_2O} (ml/h)	1,54	1,46	0,27	0,94	1,36
C_{Na} (ml/h)	0,024	0,025	0,0027	0,015	0,026
C_K (ml/h)	0,14	0,14	0,08	0,12	0,15
C_{osm}/C_{in}	0,115	0,114	0,118	0,122	0,117
C_{H_2O}/C_{in}	0,546	0,562	0,152	0,362	0,469
C_{Na}/C_{in}	0,0084	0,0095	0,0015	0,0057	0,0089
C_K/C_{in}	0,048	0,054	0,046	0,045	0,051

Expérience du 7-6-1961 (*suite*).

Abréviations : V : débit urinaire ; U_{in}/P_{in} : rapport des concentrations urinaire et plasmatique de l'inuline ; U_{osm} : pression osmotique de l'urine en milliosmoles par litre (mOsm/l) ; U_{Na} et U_K : concentrations urinaires du sodium et du potassium en milliéquivalents par litre (mEq/l) ; C_{in} : clearance de l'inuline ; C_{osm} : clearance osmotique ; C_{H_2O}, C_{Na} et C_K : clearances de l'eau libre, du sodium et du potassium ; C_{osm}/C_{in}, C_{H_2O}/C_{in}, C_{Na}/C_{in} et C_K/C_{in} : clearances relatives correspondantes. Les clearances sont exprimées en millilitres par heure (ml/h) et rapportées à 100 g de poids corporel.

Les temps de début et de fin de collection des échantillons d'urine (U_1 à U_5) sont indiqués sur la figure 4. L'échantillon U_3 correspond à la phase d'antidiurèse maximale.

Commentaires dans le texte.

diurétique important, une faible diminution de la filtration glomérulaire, et deux effets tubulaires marqués : une stimulation de la réabsorption d'eau libre et de sodium (baisse des clearances relatives C_{H_2O}/C_{in} et C_{Na}/C_{in}), alors qu'elle ne modifie pas l'intensité de la réabsorption tubulaire du potassium ou de l'ensemble des autres solutes (pas de variation des clearances relatives C_K/C_{in} et C_{osm}/C_{in}).

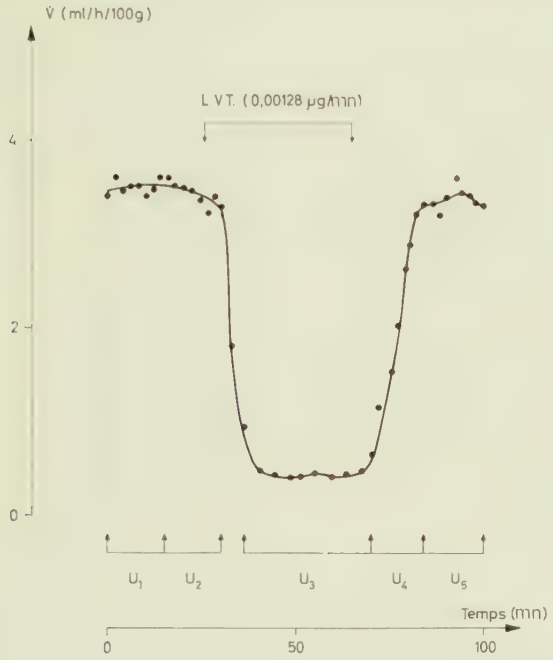


FIG. 6. — Action antidiurétique de la lysine-vasotocine.
Expérience du 25-6-1963. Grenouille : poids 60 g, opérée le 23-6-1963.
En abscisses : le temps en minutes. En ordonnées : le débit urinaire (V). Les flèches indiquent le début et la fin d'une perfusion continue de lysine-vasotocine (L.V.T.) dans l'artère iliaque. L'urine émise par les deux reins a été recueillie en 5 échantillons (U_1 à U_5) dont les temps de début et de fin de collection sont indiqués au bas de la figure.
On remarquera l'effet antidiurétique marqué de la lysine-vasotocine.

Compte tenu de la grande similitude des propriétés de l'arginine- et de la lysine-vasotocine nous présenterons simultanément dans la suite de notre exposé les résultats obtenus avec l'un ou l'autre de ces peptides.

C. Résultats d'ensemble.

Dans ce paragraphe, nous résumons les résultats de 115 expériences analogues aux deux expériences décrites ci-dessus et au cours desquelles les effets de 32 injections d'arginine-vasotocine et de 121 injections de lysine-vasotocine ont été mesurés. Dans tous les cas, les expériences ont été réalisées sur des animaux préparés au moins 24 heures au préalable et maintenus dans de l'eau courante pen-

dant toute la durée de l'expérience. L'arginine- et la lysine-vasotocine ont été administrées en dose variable d'un animal à l'autre, soit par injection intravasculaire rapide dans un petit volume (0,05 à 0,2 ml) d'une solution de Ringer, soit par perfusion continue dans l'artère iliaque pendant 20 à 40 mn. Le débit urinaire a été enregistré de manière continue et les variations de la filtration glomérulaire et de la composition de l'urine ont été suivies par l'analyse d'une série de 5 échan-

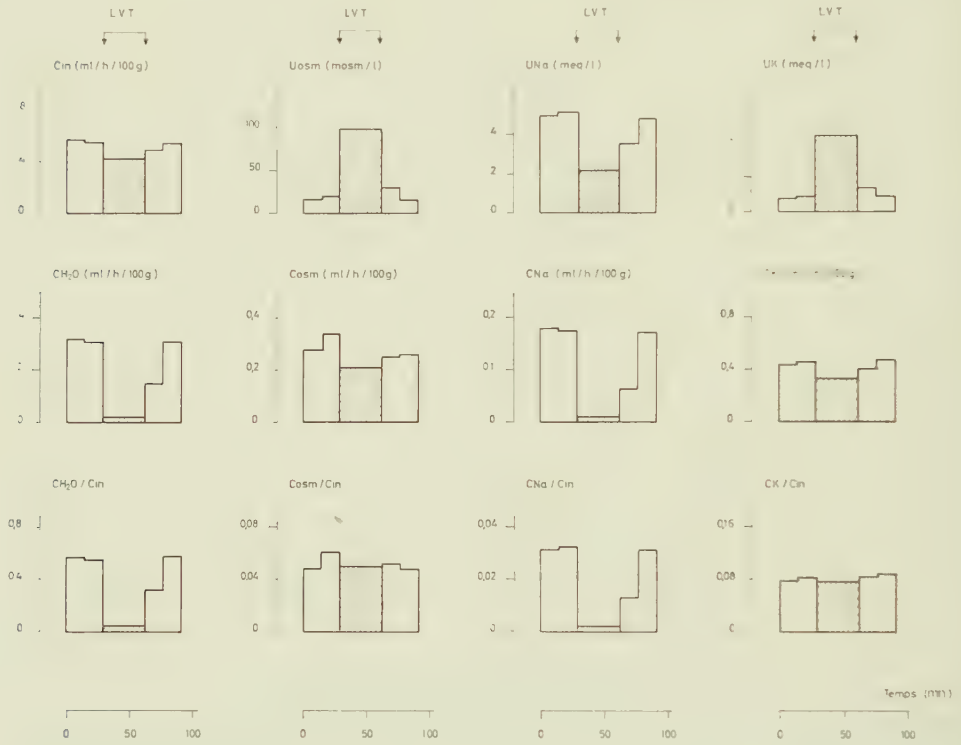


Fig. 7. — Actions de la lysine-vasotocine sur la filtration glomérulaire et la réabsorption tubulaire d'eau libre, de solutes, de sodium et de potassium.
Expérience du 25-6-1963 (*suite*). Abréviations : voir tableau IV.
On remarquera que la lysine-vasotocine (L.V.T.) produit, comme l'arginine-vasotocine, une baisse de la filtration glomérulaire et une augmentation de la réabsorption tubulaire d'eau libre et de sodium (baisse des clearances relatives C_{H_2O}/C_{in} et C_{NA}/C_{in}).

tillons d'urine correspondant respectivement à l'urine émise avant l'injection d'hormone (échantillons témoins 1 et 2), au cours de l'action antidiurétique (échantillon 3) ou pendant la période de retour aux conditions de diurèse initiales (échantillons 4 et 5). Dans le cas où la vasotocine a été administrée par perfusion continue l'échantillon caractéristique de l'action a été collecté pendant la phase d'antidiurèse maximale (voir fig. 4 et 6) ; dans le cas où l'hormone a été administrée par injection unique, la collection de l'échantillon 3 a été commencée 5 mn après l'injection et poursuivie jusqu'au milieu de la phase d'augmentation rapide du débit urinaire qui suit l'antidiurèse maximale (voir fig. 8).

Afin de permettre une analyse quantitative plus commode des résultats expérimentaux, les intensités des actions de la vasotocine ont été calculées pour chaque expérience de la manière suivante :

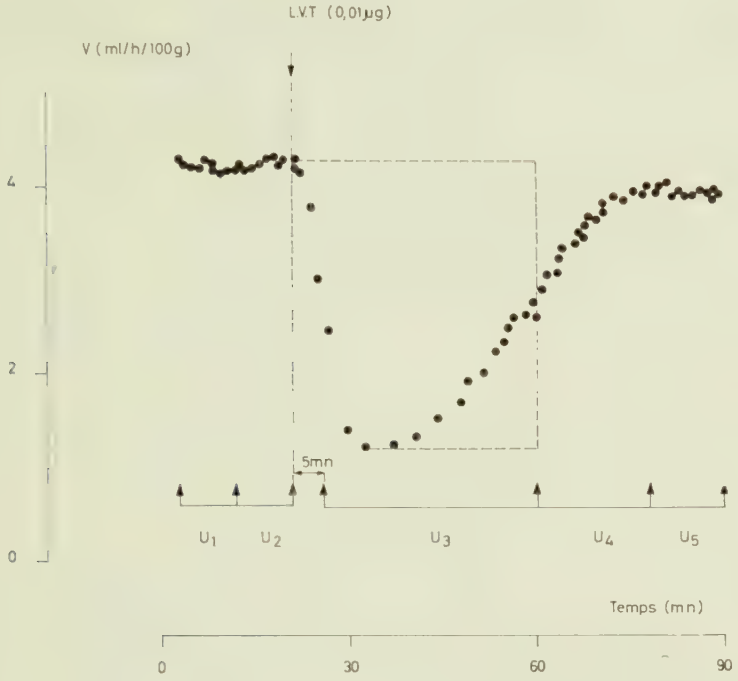


FIG. 8. — Mode de collection des échantillons d'urine dans le cas d'une injection intravasculaire rapide de vasotocine.

En abscisses : le temps en mn. En ordonnées : le débit urinaire. Les flèches, au bas de la figure, indiquent les temps de début et de fin de collection des 5 échantillons d'urine (U_1 à U_5) recueillis au cours de l'expérience.

La collection de l'échantillon U_3, caractéristique de l'action antidiurétique est commencée 5 mn après l'injection et interrompue au milieu de la phase d'augmentation rapide du débit urinaire suivant l'antidiurèse maximum.

L'action antidiurétique et la diminution du taux de filtration glomérulaire, qui lui est normalement associée, ont été mesurées respectivement par la différence entre les valeurs du débit urinaire et de la clearance de l'inuline mesurées au cours de la période de collection des urines précédant immédiatement l'injection d'hormone (échantillon U_2) et celles mesurées pendant la phase d'antidiurèse maximum (échantillon U_3). Compte tenu de la grande variabilité du débit urinaire et du taux de filtration glomérulaire observée d'un animal à l'autre indépendamment de la stimulation hormonale, les résultats ont été normalisés en rapportant la différence ainsi calculée aux valeurs témoins correspondantes. Ainsi, dans le cas de la première expérience décrite ci-dessus, et en utilisant les valeurs numériques du tableau IV, l'effet antidiurétique sera pris égal à 1,76 — 0,48/1,76 =

0,715 ou 71,5 p. 100 et l'effet glomérulaire égal à 2,60 — 1,78 /2,60 = 0,306 ou 30,6 p. 100.

TABLEAU V. — *Actions de l'arginine-vasotocine sur l'excrétion de l'eau et des électrolytes par le rein de la Grenouille : résultats d'ensemble.*

	Moyenne	Nombre de mesures	Intervalle de confiance	Comparaison à 0	
				t	P
Dose d'hormone injections (µg/100 g)	0,035	22	—	—	—
Dose d'hormone perfusions (µg/mn/100 g)	0,0030	10	—	—	—
Action antidiurétique : (% baisse V)	49,3	32	± 5,6	17,85	*P < 0,001
Effet glomérulaire : (% baisse C_{in})	26,8	23	± 6,9	7,94	*P < 0,001
Effets tubulaires :					
% baisse C_{H_2O}/C_{in}	35,8	32	± 4,4	16,37	*P < 0,001
% baisse C_{Na}/C_{in}	40,0	32	± 4,7	17,37	*P < 0,001
% baisse C_{osm}/C_{in}	5,2	32	± 7,2	1,46	0,1 < P < 0,2
% baisse C_K/C_{in}	— 3,2	32	± 14,4	0,45	0,6 < P < 0,7

Abréviations : voir tableau IV.
Les valeurs numériques indiquées sont des moyennes. Chacune d'entre elles a été comparée à 0 ; le tableau donne la valeur du coefficient t de « Student » et le seuil de probabilité correspondant.
Les astérisques indiquent une différence très significative.
L'intervalle de confiance a été calculé au seuil de probabilité de 0,05.
Commentaires dans le texte.

Les intensités des deux actions tubulaires de l'hormone : stimulation de la réabsorption d'eau libre et de sodium ont été mesurées d'une manière analogue, par la baisse, au maximum de l'effet antidiurétique, de la clearance relative de l'eau libre et de la clearance relative du sodium exprimée en p. 100 des valeurs témoins mesurées immédiatement avant l'injection d'hormone. Dans l'expérience citée en exemple, l'intensité de l'action de l'hormone sur la réabsorption tubulaire d'eau libre a été calculée : par 0,562 — 0,152 /0,562 = 0,73 ou 73 p. 100 et celle de l'action sur la réabsorption du sodium par : 0,0095 — 0,0015 /0,0095 = 0,843 ou 84,3 p. 100. Par ailleurs, pour chaque expérience, le pourcentage de variation de la clearance relative du potassium et de la clearance osmotique relative a été calculé d'une manière analogue, les valeurs obtenues étant considérées comme positives dans le cas d'une baisse et négatives dans le cas d'une augmentation.

Les tableaux V et VI donnent les moyennes des intensités ainsi calculées, des actions de l'arginine-vasotocine (tableau V) et de la lysine-vasotocine (tableau VI). L'analyse des valeurs numériques présentées montre que, pour l'ensemble des expériences réalisées ces deux peptides, administrés en faibles doses à la Grenouille, produisent un effet antidiurétique marqué associé à une baisse du taux de filtration glomérulaire d'intensité relative plus faible mais néanmoins très significative ; elle met en outre en évidence les deux actions tubulaires de l'hormone : stimulation de la réabsorption tubulaire d'eau libre et de sodium que traduit la baisse de la clearance relative de l'eau libre (diminution de la fraction de l'eau filtrée présente dans l'urine définitive sous forme d'eau libre) et de la clearance relative du sodium (diminution de la fraction du sodium filtré qui est excrété).

En revanche, les vasotocines ne produisent aucune modification de la clearance relative du potassium et, bien que la concentration du sodium dans l'urine définitive soit abaissée sous l'action de l'hormone, la clearance osmotique relative n'est pas significativement diminuée.

TABLEAU VI. — *Actions de la lysine-vasotocine : résultats d'ensemble.*

	Moyenne	Nombre de mesures	Intervalle de confiance	Comparaison à o	
				t	P
Dose d'hormone : Injections (µg/100 g)	0,052	55	—	—	—
Dose d'hormone : perfusions (µg/mn/100 g)	0,0041	66	—	—	—
Action antidiurétique : (% baisse V)	58,6	121	± 4,0	29,23	*P < 0,001
Effet glomérulaire : (% baisse C_{in})	42,1	121	± 4,6	18,28	*P < 0,001
Effets tubulaires :					
% baisse C_{H_2O}/C_{in}	35,9	121	± 2,8	25,36	*P < 0,001
% baisse C_{Na}/C_{in}	49,0	121	± 3,5	27,77	*P < 0,001
% baisse C_{osm}/C_{in}	0,4	121	± 3,6	0,221	0,8 < P < 0,9
% baisse C_K/C_{in}	— 2,2	121	± 5,4	0,829	0,4 < P < 0,5

Légende voir tableau V.
On remarquera que les effets produits par la lysine-vasotocine sont comparables à ceux de l'hormone naturelle.

De plus, les deux actions tubulaires de la vasotocine sont toujours associées et d'intensité comparable. Comme le montrent les fig. 9 et 10, il existe une corrélation significative (coefficient de corrélation $r = 0,665$ $P < 0,001$ dans le

cas de l'arginine-vasotocine et $r = 0{,}719$ $P < 0{,}001$ dans le cas de la lysine-vasotocine) entre la baisse de la clearance relative de l'eau libre et la baisse de la clearance relative du sodium. Les pentes des droites de régression linéaire calculées pour ces deux peptides ne diffèrent pas significativement l'une de l'autre au seuil de probabilité de 0,05. En revanche, il n'existe pas de corrélation significative entre la baisse de la filtration glomérulaire et l'un ou l'autre des deux effets tubulaires de la vasotocine, comme le montrent les résultats de l'analyse statistique présentés dans le tableau VII.

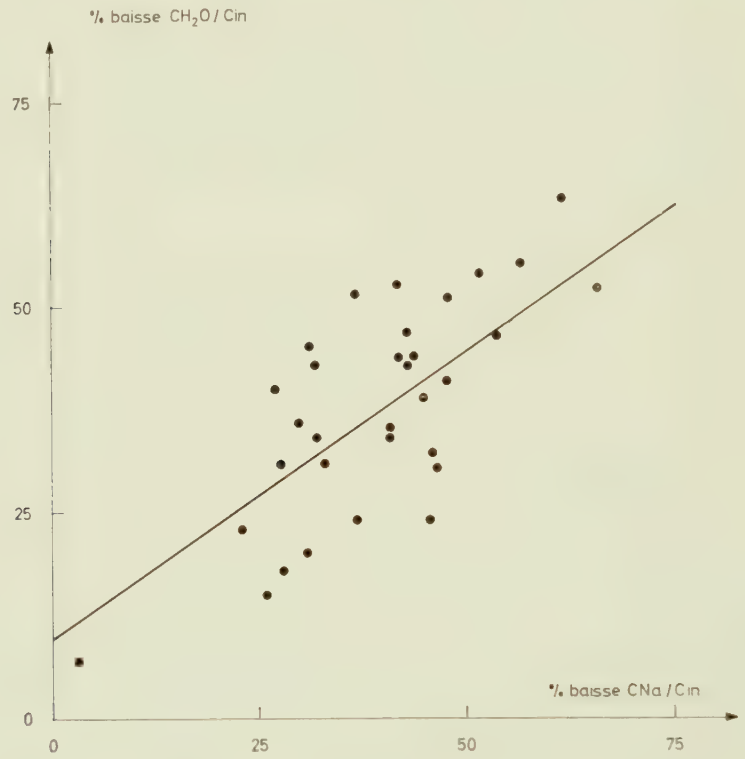


FIG. 9. — Relation entre les intensités des deux actions tubulaires de l'arginine-vasotocine.

En abscisses : la baisse de la clearance relative du sodium (en p. 100 des valeurs témoins). En ordonnées : la baisse de la clearance relative de l'eau libre exprimée de la même manière. Coefficient de corrélation : $r = 0{,}665$ $P < 0{,}001$.

Équation de la droite de régression linéaire : $y = (0{,}693 \pm 0{,}286)\,x + 9{,}55$. La pente est donnée avec son intervalle de confiance au seuil de probabilité de 0,05.

Signalons, à ce propos, que dans plusieurs expériences, une diminution marquée des clearances relatives de l'eau libre et du sodium a pu être observée sans modification de la clearance de l'inuline.

Remarquons, enfin, que les quantités d'arginine- et de lysine-vasotocine, nécessaires pour produire un effet antidiurétique comparable, sont du même ordre de grandeur et dans les deux cas très faibles ; ainsi, la dose moyenne d'arginine-

vasotocine de 0,035 µg pour 100 g de poids corporel correspond à une concentration de 1 · 10 ^{9} M dans les liquides extracellulaires, en admettant que le volume

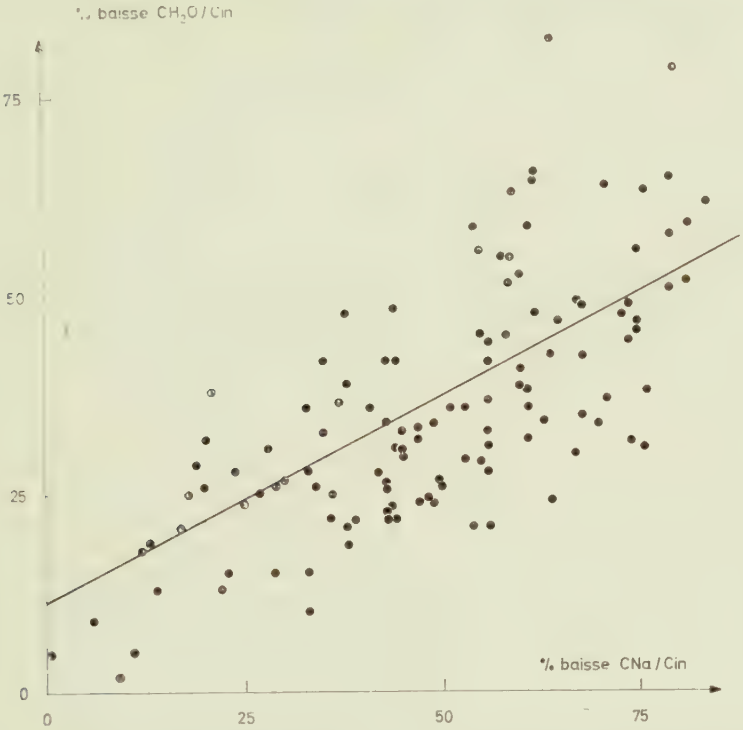


FIG. 10. — Relation entre les intensités des deux actions tubulaires de la lysine-vasotocine.
Légende : voir fig. 9. Coefficient de corrélation $r = 0{,}719$, $P < 0{,}001$. Équation de la droite de régression linéaire : $y = (0{,}491 \pm 0{,}114)\,x + 11{,}76$.
On remarquera que la pente calculée ne diffère pas significativement de la pente de la droite de régression linéaire de la fig. 9 (recouvrement des intervalles de confiance au seuil de probabilité de 0,05).

de distribution de l'hormone représente 30 p. 100 du poids du corps (le poids moléculaire de la vasotocine est environ de 1 000) ; les doses actives les plus faibles (0,001 µg/100 g) correspondraient à une concentration de 3×10^{-11} M. De fait les hormones neurohypophysaires injectées à l'animal entier étant rapidement détruites, la concentration de la vasotocine effectivement atteinte au niveau du rein est probablement plus faible encore. Compte tenu des grandes différences de sensibilité observées d'un animal à l'autre, il n'existe pas, en considérant l'ensemble de nos expériences, de corrélation significative entre la dose d'hormone administrée et l'intensité de l'un quelconque des effets mesurés. Toutefois, dans les cas ou plusieurs doses de vasotocine ont été successivement injectées au même animal, l'intensité de l'action antidiurétique, et des deux effets tubulaires est d'autant plus marquée que la quantité d'hormone administrée est plus grande. Les résultats d'une analyse précise de la relation liant l'intensité des effets biologiques à la dose de vasotocine injectée seront présentés dans la troisième partie de notre exposé.

TABLEAU VII. — *Corrélation entre l'effet glomérulaire et les deux actions tubulaires de la vasotocine.*

Corrélations	r	n	t	P
Arginine-vasotocine				
% baisse C_{in} et % baisse C_{H_2O}/C_{in}	0,024	32	0,131	$0,8 < P < 0,9$
% baisse C_{in} et % baisse C_{Na}/C_{in}	0,164	32	0,911	$0,3 < P < 0,4$
Lysine-vasotocine				
% baisse C_{in} et % baisse C_{H_2O}/C_{in}	0,102	121	1,118	$0,2 < P < 0,3$
% baisse C_{in} et % baisse C_{H_2O}/C_{in}	0,094	121	1,023	$P \neq 0,3$

Abréviations : r : coefficient de corrélation ; n : nombre de mesures ; t : coefficient de « Student » calculé par $r \sqrt{n-2}/(1-r^2)$; P : seuil de probabilité.

Des valeurs de $P > 0,05$ indiquent que le coefficient de corrélation r n'est pas significativement différent de 0.

D. Résumé et discussion.

L'application de la méthode des clearances comparées à l'étude de l'action de la vasotocine sur le rein de la Grenouille, met en évidence une double action de l'hormone qui diminue le taux de filtration glomérulaire et stimule spécifiquement les processus de réabsorption tubulaire d'eau libre et de sodium. Elle ne permet pas, toutefois, de préciser les mécanismes impliqués. Ces résultats seront discutés en détail dans un chapitre ultérieur de notre exposé ; signalons cependant dès maintenant que l'augmentation de la réabsorption d'eau et de sodium observée au cours de l'action antidiurétique de la vasotocine n'implique pas nécessairement une action directe de l'hormone sur ces processus ; elle pourrait être la conséquence indirecte de la baisse de la filtration glomérulaire qui lui est associée. En effet, si celle-ci résulte pour l'ensemble des néphrons d'une diminution du débit de l'ultrafiltrat glomérulaire délivré aux tubules, l'augmentation du temps de transit de l'urine intratubulaire qui en est la conséquence pourrait, à elle seule, rendre compte d'une meilleure efficacité des processus de réabsorption d'eau et d'électrolytes et, partant, expliquer les effets tubulaires de la vasotocine. Aussi, nous a-t-il paru important de définir, dans le cadre de ce travail, la nature de la baisse de filtration glomérulaire produite par l'injection de vasotocine à la Grenouille. Les résultats de cette étude sont présentés dans le chapitre suivant.

CHAPITRE III

MÉCANISME DES VARIATIONS DE LA FILTRATION GLOMÉRULAIRE PRODUITES PAR L'INJECTION DE VASOTOCINE A LA GRENOUILLE

A. Principe de la méthode.

Depuis les observations classiques de Richards et Schmidt (1924) qui ont montré par l'examen microscopique direct de la surface du rein de la Grenouille qu'un nombre réduit de glomérules se trouvent simultanément en activité, de nombreux auteurs ont établi que des modifications importantes de la filtration glomérulaire produites chez les Amphibiens par l'augmentation du volume des liquides extracellulaires, l'injection d'urée ou de caféine (Richards et Schmidt, 1924), l'injection d'adrénaline (Bieter, 1930), ou la stimulation des nerfs splanchniques (Richards et coll., 1927 ; White, 1929 ; Bieter, 1930) peuvent résulter d'une modification du nombre des glomérules fonctionnels. Dans ce travail, nous avons recherché si un mécanisme analogue pouvait rendre compte de la baisse de la filtration glomérulaire produite par l'administration de vasotocine à la Grenouille. Pour cette étude, nous avons employé la méthode élégante introduite par Forster (1942) dont le principe consiste à suivre simultanément les variations de la filtration glomérulaire et d'une grandeur proportionnelle à la masse de tissu tubulaire actif, cette dernière représentant une mesure relative du nombre de néphrons fonctionnels. La capacité maximum de réabsorption du glucose qui, dans des conditions physiologiques définies, varie peu dans le temps et ne dépend pas de la concentration du glucose dans le plasma ou dans l'urine, constitue l'une des meilleures mesures des activités tubulaires de l'ensemble du rein. Forster a effectivement montré, au cours de modifications spontanées de la filtration glomérulaire chez la Grenouille, que la capacité maximum de réabsorption du glucose varie proportionnellement à la clearance de l'inuline d'une part, et au nombre de glomérules en activité mesuré simultanément par observation directe de la surface du rein d'autre part, établissant ainsi le bien-fondé de la méthode proposée.

B. Protocole expérimental.

Cette étude a été réalisée sur un groupe de 6 animaux préparés de la manière habituelle. Les expériences ont été conduites selon un protocole identique à celui employé pour l'étude des actions de la vasotocine (voir chapitre précédent) ; mais, pendant toute la durée de l'expérience, la glycémie des animaux a été artificiellement élevée et maintenue à une valeur sensiblement constante par injection continue dans l'artère iliaque de 0,02 ml par mn d'une solution de 50 mM /l de glucose dans du liquide de RINGER. Au cours de l'expérience, une ou deux doses de lysine-vasotocine (0,005 à 0,02 µg) ont été administrées par injection intravasculaire rapide. L'urine émise par les deux reins a été recueillie par échantillons successifs caractéristiques de l'action antidiurétique de l'hormone ou des périodes témoins précédant ou séparant les injections. Au milieu de chaque période de collection des urines, 0,2 ml de sang ont été prélevés dans l'artère iliaque après un rinçage soigneux du cathéter avec du liquide de RINGER puis centrifugés et décantés. A la fin de l'expérience, en plus des dosages chimiques habituels, la concentration du glucose a été déterminée dans chaque échantillon d'urine et de plasma par une méthode enzymatique à la glucose-oxydase (Boehringer Blutzucker Farb-test sur un volume de 0,05 ml.

Pour chaque période de collection des urines, la capacité maximum de réabsorption du glucose a été calculée par la différence entre la quantité filtrée, produit du débit de filtration glomérulaire (clearance de l'inuline) par la concentration du glucose dans le plasma (1), et la quantité excrétée, produit du débit urinaire par la concentration du glucose dans l'urine. Les résultats ont été exprimés en mg /h et rapportés à 100 g de poids corporel.

C. Résultats.

Le tableau VIII et la fig. 11 illustrent les résultats d'une expérience caractéristique.

La fig. 11 montre que la baisse du taux de filtration glomérulaire produite par la vasotocine est accompagnée d'une diminution parallèle de la quantité de glucose réabsorbée par le rein ; pour l'ensemble des périodes de mesures il existe une corrélation stricte entre ces deux grandeurs. Les valeurs du tableau VIII montrent que pendant toute la durée de l'expérience la concentration du glucose dans l'urine est importante ; pendant la période d'antidiurèse maximale, elle croît dans un rapport voisin de celui de la concentration de l'inuline. Ces dernières observations indiquent que la baisse de la quantité de glucose réabsorbé par le rein ne résulte pas d'une saturation incomplète des capacités de réabsorption pour une partie seulement de l'ensemble des néphrons ; elle traduit donc une diminution de la masse de tissu tubulaire actif et, par conséquent, une variation du nombre des glomérules fonctionnels.

(1) Le glucose étant administré par perfusion continue, sa concentration dans le plasma varie peu au cours de l'expérience ; la concentration instantanée mesurée au milieu de chaque période de collection des urines peut être considérée comme représentative de l'ensemble de la période considérée.

La fig. 12 résume l'ensemble des résultats obtenus. On remarquera que dans tous les cas une relation linéaire lie l'intensité de la filtration glomérulaire et la quantité de glucose réabsorbée par le rein. La capacité maximale de réabsorption

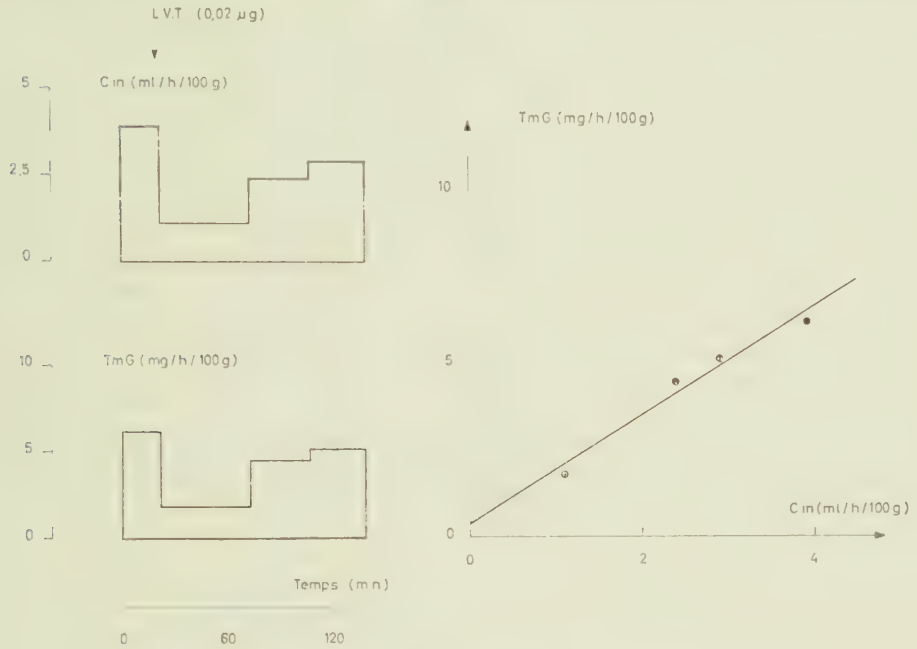


FIG. 11. — Variations de la quantité de glucose réabsorbée par le rein au cours de l'action de la lysine-vasotocine.

Expérience du 21-11-1962. Grenouille : poids 83 g, opérée le 10-11-1962.

Partie gauche : En abscisses : le temps en mn. En ordonnées : la clearance de l'inuline (C_{in}) et la capacité maximum de réabsorption du glucose (Tm_G). La flèche indique l'injection de 0,02 µg de lysine-vasotocine (L.V.T.) dans l'artère iliaque.

Partie droite : En abscisses : la clearance de l'inuline. En ordonnées : la capacité maximum de réabsorption du glucose.

On remarquera que la baisse de la filtration glomérulaire produite par la vasotocine s'accompagne d'une diminution proportionnelle de la quantité de glucose réabsorbée par le rein.

exprimée en mg et rapportée à 100 ml de filtrat glomérulaire reste sensiblement constante au cours de l'expérience pour un animal donné mais varie dans d'assez larges limites d'une grenouille à l'autre. Les valeurs extrêmes sont respectivement de 75 et 220 mg pour 100 ml de filtrat glomérulaire ; la valeur moyenne de 126 ± 45 mg/100 ml est proche de 156 mg/100 ml valeur mesurée par FORSTER (1942) chez *Rana catesbiana*.

Pour l'ensemble des 12 injections de vasotocine étudiées, une corrélation étroite ($r = 0{,}928$, $P < 0{,}001$) lie l'effet glomérulaire (baisse de la clearance de l'inuline exprimée en p. 100 de la valeur témoin précédant l'injection d'hormone) et la baisse de la capacité maximum de réabsorption du glucose exprimée de la même manière (voir fig. 13). La pente de la droite de régression linéaire (fig. 13) ne diffère pas significativement de 1 ($a = 0{,}821$, $t = 1{,}719$, $0{,}1 < P < 0{,}2$).

TABLEAU VIII. — *Mesure de la capacité maximale de réabsorption du glucose par le rein de la Grenouille ; étude de ses variations au cours de l'action antidiurétique de la lysine-vasotocine.*

Échantillon	V (ml/h/100 g)	$(U/P)_{in}$	C_{in} (ml/h/100 g)	U_G (mg/ml)	P_G (mg/ml)	Tm_G (mg/h)
U_1 (témoin)...	2,04	1,90	3,88	4,77	4,12	6,25
U_2 (LVT).....	0,25	4,45	1,12	11,60	4,20	1,80
U_3 (LVT).....	0,82	3,00	2,46	5,12	4,35	4,50
U_4 (témoin)...	1,61	1,80	2,90	4,84	4,50	5,25

Expérience du 21-11-1962.

Abréviations : V : débit urinaire $(U/P)_{in}$: rapport des concentrations urinaire et plasmatique de l'inuline ; C_{in} : clearance de l'inuline ; U_G, P_G : concentration du glucose dans l'urine et dans le plasma ; Tm_G : capacité maximum de réabsorption du glucose.

Commentaires dans le texte.

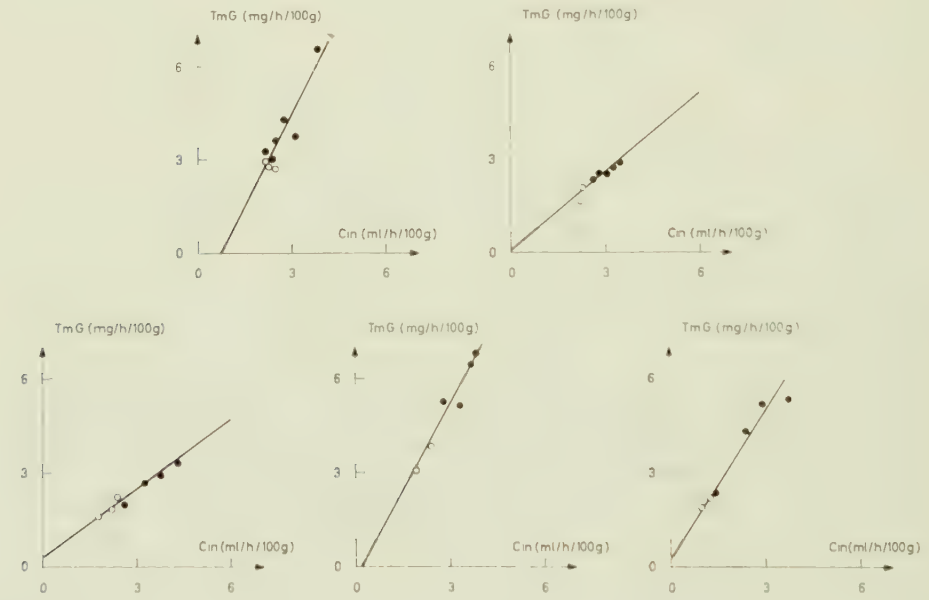


FIG. 12. — Relation entre l'intensité de la filtration glomérulaire et la capacité maximum de réabsorption du glucose par le rein de la Grenouille.

Chaque courbe se réfère aux résultats d'une expérience distincte. En abscisses : la clearance de l'inuline ; en ordonnées : la capacité maximale de réabsorption du glucose. Les cercles évidés correspondent aux échantillons d'urine recueillis au cours de l'action de l'hormone et les cercles pleins aux échantillons témoins.

Dans cette série expérimentale, les doses de vasotocine employées ont produit une baisse moyenne de 45 ± 4 p. 100 de la clearance relative de l'eau libre et une diminution de 47 ± 7 p. 100 de la clearance relative du sodium.

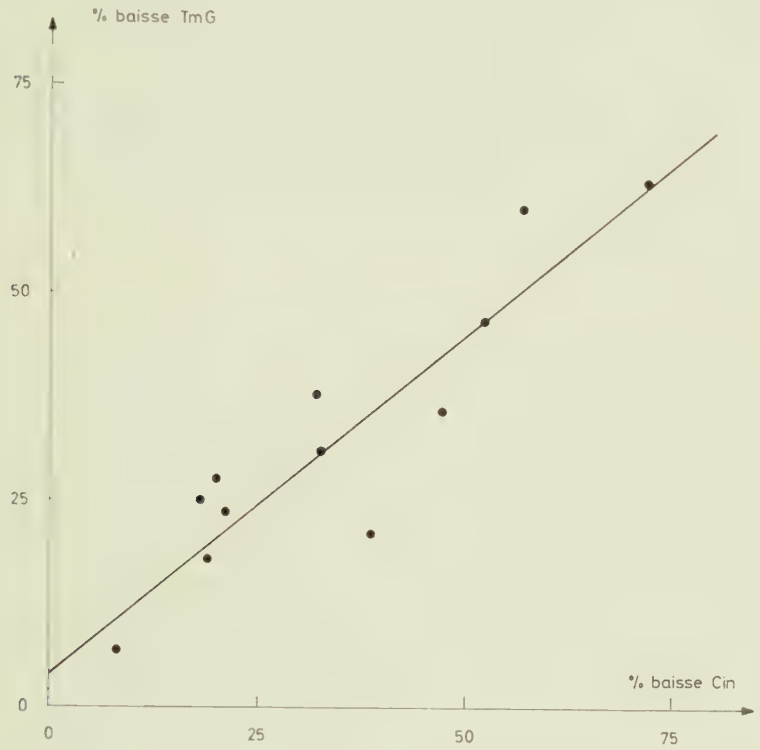


FIG. 13. — Relation entre la diminution de la quantité de glucose réabsorbé et la baisse du taux de filtration glomérulaire observées sous l'action de la lysine-vasotocine. En abscisses : la baisse de la filtration glomérulaire mesurée au maximum de l'effet antidiurétique de la lysine-vasotocine (6 expériences, 12 injections d'hormone) et exprimée en p. 100 de la valeur témoin précédant l'injection. En ordonnées : la baisse de la capacité maximum de réabsorption du glucose exprimée de la même manière.
Équation de la droite de régression linéaire : $y = 0{,}821\ x + 4$.
La pente voisine de l'unité indique que les variations de la filtration glomérulaire produites par l'hormone résultent entièrement d'une diminution du nombre des néphrons fonctionnels.

D. Interprétation.

La baisse de la capacité maximale de réabsorption du glucose associée à la diminution de la filtration glomérulaire indique que sous l'action de l'hormone la masse de tissu tubulaire actif et par conséquent le nombre de néphrons en activité, sont diminués. Aux erreurs expérimentales près, les variations relatives de la clearance de l'inuline et de la quantité de glucose réabsorbée sont égales. La

baisse de filtration glomérulaire produite par l'injection de vasotocine résulterait donc entièrement d'une variation du nombre de glomérules fonctionnels.

Un tel mécanisme qui n'implique pas de modifications du temps de contact de l'urine primitive avec les cellules tubulaires ne saurait rendre compte à lui seul d'une augmentation de la réabsorption d'eau libre et de sodium ; celle-ci résultant vraisemblablement d'une action tubulaire directe de l'hormone. Comme nous l'exposons dans le chapitre suivant, nous avons recherché la localisation de cette action le long du néphron en tirant parti des caractères particuliers de l'irrigation des cellules tubulaires chez la Grenouille.

CHAPITRE IV

COMPARAISON DES RÉPONSES DES DEUX REINS A UNE PERFUSION UNILATÉRALE DE LYSINE-VASOTOCINE DANS UNE VEINE PORTE RÉNALE

A. But et principe de la méthode.

Chez les Amphibiens, l'existence d'une double irrigation des cellules tubulaires par le sang provenant des artérioles postglomérulaires, d'une part, et de la veine porte rénale, d'autre part, fournit à l'expérimentateur une méthode d'étude commode des fonctions tubulaires indépendamment de la filtration glomérulaire. Cette méthode permet, jusqu'à un certain point, de localiser les processus étudiés puisque le sang de la veine porte rénale n'irrigue que les tubules contournés proximaux. Dans ce travail, nous avons tenté de localiser le site d'action de l'hormone le long du néphron en comparant les réponses des deux reins au cours de perfusions unilatérales de vasotocine dans une veine porte rénale. L'injection continue de vasotocine dans une veine porte rénale permet de maintenir une concentration d'hormone plus élevée dans le rein perfusé que dans le rein témoin. La différence de concentration très marquée au début de la perfusion s'atténue progressivement dans le temps pour atteindre une valeur d'équilibre qui est fonction du débit du sang dans la veine porte rénale, du volume de distribution de l'hormone et de sa vitesse de destruction ou d'élimination.

En admettant que la vitesse de destruction de l'hormone est proportionnelle à sa concentration $(x)_s$ dans le sang systémique, celle-ci est donnée par la relation :

$(x)_s = \frac{I_x}{V \times D_x} [1 - e^{-D_x t}]$ où V représente le volume de distribution de l'hormone, D_x, son coefficient de destruction, I_x, le taux d'injection et t le temps. La concentration d'hormone dans la veine porte du côté perfusé $(x)_p$ est donnée par :

$(x)_p = (x)_s + \frac{I_x}{V_p}$ où V_p représente le débit du sang dans la veine porte.

Le rapport des concentrations de l'hormone dans le rein perfusé et dans le rein témoin est donc égal à :

$$\frac{(x)_p}{(x)_s} = 1 + \frac{V \cdot D_x}{V_p [1 - e^{-D_x t}]}$$

A l'équilibre, ce rapport tend vers : $1 + \frac{V}{V_p} D_x$. En prenant un volume de distribution égal à 30 p. 100 du poids du corps, le débit du sang dans la veine porte égal à 0,3 ml/mn pour 100 g de poids corporel (valeur mesurée par FORSTER, 1943, chez *Rana catesbiana*) et D_x égal à 0,14 (ordre de grandeur que nous avons choisi en fonction des mesures effectuées chez les Mammifères et en tenant compte d'une vitesse de destruction probablement plus faible chez les poïkilothermes que chez les homéothermes), la valeur du rapport $(x)_p/(x)_s$ serait de 14. Cette dernière est suffisamment élevée pour qu'une différence de réponse des deux reins à une perfusion unilatérale de vasotocine dans la veine porte rénale puisse être mise en évidence si le site des actions tubulaires de l'hormone est situé sur la partie des néphrons irriguée par le sang de la veine porte rénale.

B. Protocole expérimental.

Préparation des animaux.

Après la cathétérisation des deux uretères et de l'artère iliaque commune gauche, réalisée comme nous l'avons décrit précédemment, l'extrémité étirée d'un cathéter de polyéthylène rempli d'héparine (diamètre externe 0,2 mm environ) est introduite jusque dans la veine porte rénale gauche par l'intermédiaire d'une veine issue de la paroi cloacale et qui débouche dans la veine porte près de son entrée dans le rein. A la fin de l'opération, le cathéter veineux et les cathéters urétéraux et artériel sont fixés par deux ligatures sur l'extrémité de l'urostyle et sur la peau de la cuisse, l'incision dorsale est soigneusement suturée, puis les animaux sont placés dans de l'eau courante et conservés de la manière habituelle ; les expériences sont réalisées le lendemain de l'opération. Ce mode de préparation permet une injection continue dans la veine porte rénale sans modifications hémodynamiques importantes : le débit du sang dans la branche cathétérisée étant négligeable par rapport au débit du tronc principal. Au cours d'expériences préliminaires, l'observation des deux reins pendant l'injection d'un colorant dans le cathéter veineux, n'a montré aucune connexion vasculaire directe entre les deux reins ; le colorant se répartissant intégralement dans la partie dorsale du rein perfusé.

Conduite des expériences.

Au début de l'expérience, 40 mg d'inuline sont administrés par injection dans l'artère iliaque puis le débit d'urine de chacun des deux reins est enregistré séparément. Après une période d'équilibration de 45 mn, 4 doses successives de lysine-vasotocine sont administrées par perfusion continue dans la veine porte rénale (débit d'injection 0,01 ml/mn). La durée de chaque perfusion est de 20 mn et les quantités de vasotocine injectée de 0,0005, 0,001, 0,002 et 0,005 µg/mn respectivement. Afin de contrôler l'efficacité de la perfusion du système porte rénal, une faible quantité de radiopotassium ^{42}K sous forme de chlorure a été ajoutée

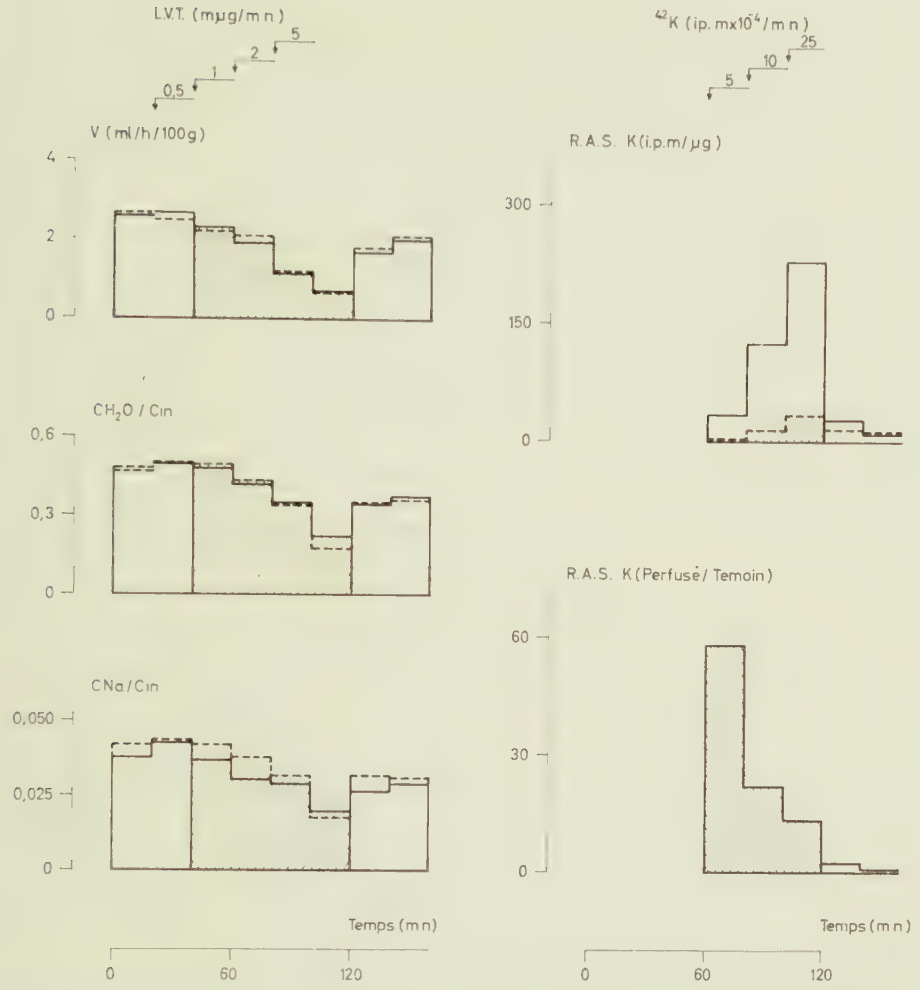


FIG. 14. — Comparaison des réponses des deux reins à une perfusion unilatérale de lysine-vasotocine dans la veine porte rénale gauche.

Expérience du 23-10-1962. Grenouille : poids 75 g, opérée le 22-10-1962.

En abscisses : le temps en mn. En ordonnées : de haut en bas et de gauche à droite : le débit urinaire (V), la clearance relative de l'eau libre (C_{H_2O}/C_{in}) et du sodium (C_{NA}/C_{in}), la radioactivité spécifique du potassium dans l'urine (RAS.K) en impulsions par mn et par microgramme (i.p.m/μg). En bas, à droite : le rapport des radioactivités spécifiques du potassium dans l'urine du rein perfusé et l'urine du rein témoin. En traits pleins, les valeurs mesurées sur le rein perfusé ; en pointillés, les valeurs mesurées sur le rein témoin. Les flèches indiquent le début et la fin de 4 perfusions de lysine-vasotocine (L.V.T.) dans la veine porte rénale gauche.

Pour les trois dernières, du potassium radioactif ^{42}K a été ajouté à la solution d'hormone.

Les hachures indiquent les périodes de perfusion.

On remarquera que les réponses des deux reins à l'injection d'hormone sont identiques, alors que l'excrétion du potassium radioactif est beaucoup plus marquée du côté perfusé.

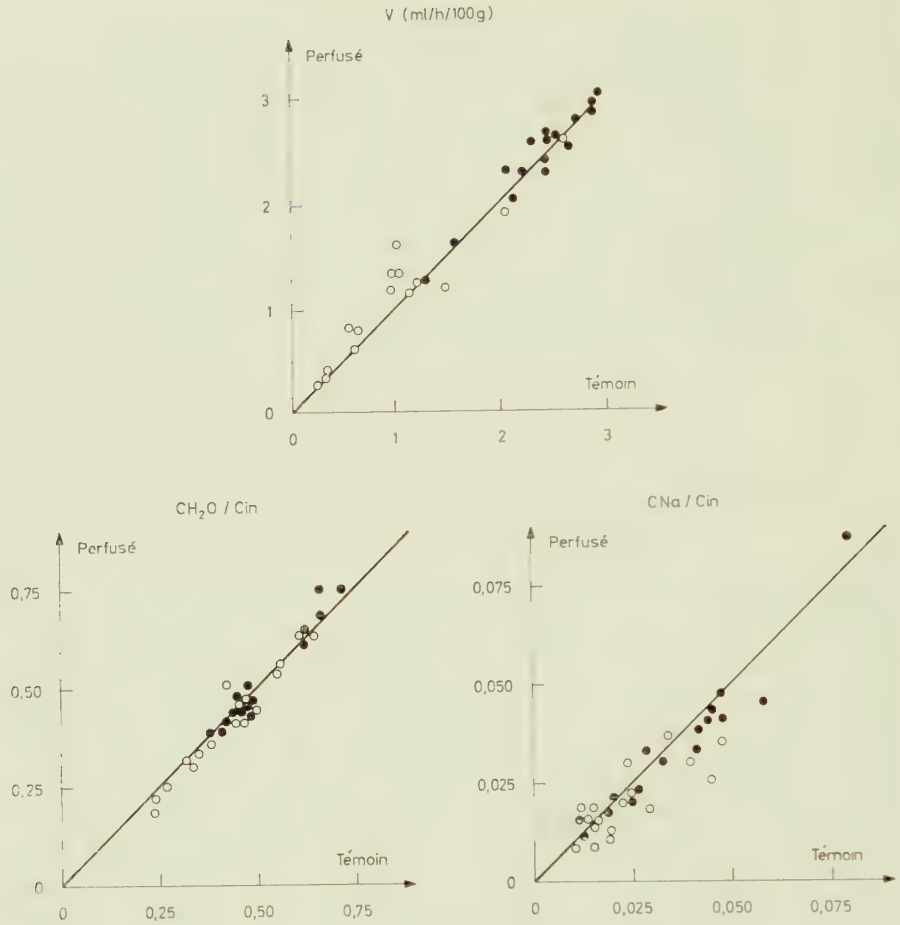


FIG. 15. — Résultats d'ensemble.

La figure résume les résultats de 5 expériences.

En abscisses : les valeurs mesurées sur le rein témoin. En ordonnées : les valeurs mesurées sur le rein perfusé. Les cercles pleins correspondent aux périodes témoins et les cercles évidés aux périodes de perfusion de lysine-vasotocine dans la veine porte rénale gauche.

Abréviations : voir fig. 14.

Aucune des pentes des droites de régression linéaire ($y = 0{,}936\,x + 0{,}19$ pour le débit urinaire, $y = 1{,}083\,x - 0{,}035$ pour la clearance relative de l'eau libre et $y = 0{,}824\,x + 0{,}0022$ pour la clearance relative du sodium) ne diffère significativement de 1 au seuil de probabilité de 0,05, comme l'indique la distribution des points expérimentaux autour de la première bissectrice tracée sur la figure.

aux solutions d'hormone utilisées pour les trois dernières perfusions. Les parois tubulaires étant perméables à la diffusion passive du potassium, l'introduction directe de l'indicateur dans le sang de la veine porte rénale doit conduire, en effet, à une excrétion préférentielle de radiopotassium dans l'urine du rein perfusé. L'urine émise par les deux reins est recueillie séparément en échantillons caractéristiques des périodes témoins ou de l'action antidiurétique de chacune des

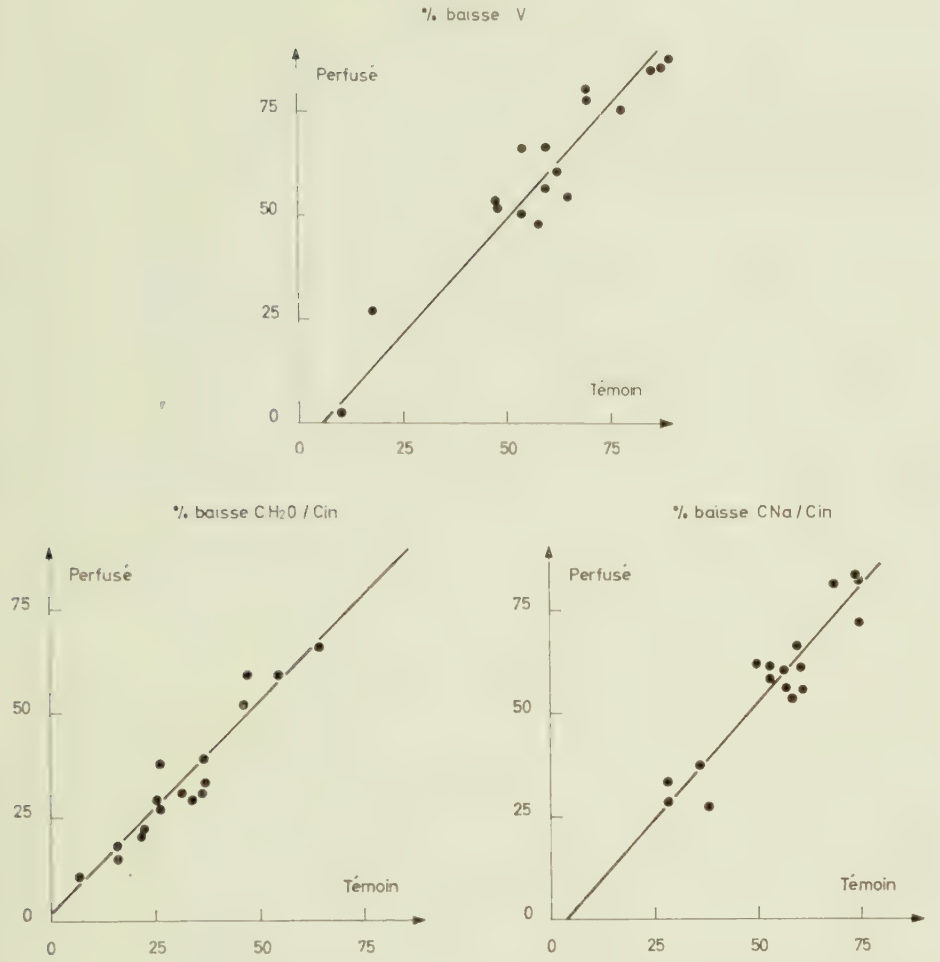


FIG. 16. — Comparaison de l'effet antidiurétique et des deux effets tubulaires mesurés simultanément sur les deux reins au cours de perfusions unilatérales de lysine-vasotocine dans une veine porte rénale.

Les effets de la vasotocine ont été mesurés respectivement par la baisse du débit urinaire (V) et des clearances relatives de l'eau libre (C_{H_2O}/C_{in}) et du sodium (C_{NA}/C_{in}) rapportées aux valeurs témoins précédant l'injection.

En abscisses : les effets mesurés sur le rein témoin. En ordonnées : les effets mesurés sur le rein perfusé. Aucune des pentes des droites de régression linéaire ($y = 1{,}017\,x - 7{,}20$ pour l'effet antidiurétique, $y = 1{,}050\,x + 1{,}48$ pour la baisse de la clearance relative C_{H_2O}/C_{in} et $y = y = 1{,}093\,x - 2{,}51$ pour la baisse de la clearance relative C_{NA}/C_{in}) ne diffère significativement de 1 au seuil de probabilité de 0,05.

perfusions d'hormone et toutes les 30 mn 0,2 ml de sang sont prélevés dans l'artère iliaque. A la fin de l'expérience, en plus des dosages chimiques habituels, la concentration du radiopotassium dans l'urine et dans le plasma a été mesurée par scintillation dans un cristal-puits d'INa activé au thallium.

C. Résultats.

Comme le montre la fig. 14 qui illustre les résultats d'une expérience caractéristique, la vasotocine perfusée dans la veine porte rénale gauche produit un effet antidiurétique et une baisse des clearances relatives de l'eau libre et du sodium d'intensité comparable sur les deux reins ; alors que le radiopotassium administré simultanément par la même voie se retrouve dans l'urine du rein perfusé à une concentration plus élevée que dans l'urine du rein témoin.

La fig. 15 résume les résultats de 5 expériences analogues. On observe que, pour l'ensemble des périodes de collection d'urine, les valeurs absolues du débit urinaire et des clearances relatives de l'eau libre et du sodium mesurées sur le rein perfusé sont très voisines des valeurs mesurées sur le rein témoin. La figure 16 montre que les intensités de l'effet antidiurétique et des deux actions tubulaires de la vasotocine mesurées de la manière habituelle sont identiques pour les deux reins ; alors que le rapport des radioactivités spécifiques du potassium dans l'urine du rein perfusé et l'urine du rein témoin est, dans tous les cas, beaucoup plus grand que l'unité. Au cours de la première période de perfusion de radiopotassium ; la valeur moyenne obtenue est de 25, les valeurs extrêmes sont respectivement 7 et 58.

D. Interprétation et discussion.

Les résultats présentés dans ce chapitre montrent que les réponses des deux reins à une perfusion unilatérale de faibles doses de vasotocine dans une veine porte rénale, sont identiques, bien que la concentration d'hormone soit plus élevée dans le rein perfusé que dans le rein témoin, comme l'indique l'excrétion préférentielle du radiopotassium dans l'urine du rein perfusé.

Plusieurs mécanismes simples pourraient rendre compte de ces observations :

1° une transformation chimique de l'hormone indispensable à son activité biologique s'opère dans un organe différent du rein ;

2° l'hormone n'agit qu'au contact de la face intraluminale des cellules tubulaires et doit donc être préalablement filtrée ;

3° le site des actions tubulaires de la vasotocine n'est pas situé sur le segment des néphrons irrigué par le sang de la veine porte rénale.

Plusieurs arguments permettent d'exclure les deux premières hypothèses. D'une part, la vasotocine est active *in vitro* sur la peau et la vessie de la Grenouille à des concentrations aussi faibles que celles qui produisent un effet antidiurétique caractéristique chez l'animal entier (JARD et coll., 1960). D'autre part, les hormones neurohypophysaires n'agissent sur ces structures que lorsqu'elles sont appliquées au contact de la face séreuse des cellules (FUHRMAN et USSING, 1951). En revanche, le sang de la veine porte rénale n'irriguant que la partie proximale et les segments terminaux des néphrons (voir chapitre I) il est possible de rendre compte des résultats décrits si l'on admet que le site des actions tubulaires des

peptides neurohypophysaires est localisé chez la Grenouille, comme chez les Mammifères, au niveau du tubule contourné distal, irrigué sur la plus grande partie de son trajet par les artérioles postglomérulaires. La perfusion continue de vasotocine dans le réseau des capillaires artériels d'un seul des deux reins, qui permettrait de confirmer ou d'invalider l'hypothèse proposée, est techniquement difficile à réaliser chez la Grenouille ; en effet, chez cette espèce, les artères rénales, au nombre de 5 par rein, sont dépourvues de collatérales expérimentalement accessibles sur l'ensemble de leur trajet extrarénal.

Signalons que des résultats analogues à ceux que nous décrivons chez la Grenouille ont été obtenus récemment chez le Poulet (Skadauge, 1964).

Enfin, l'excrétion de radiopotassium plus élevée dans l'urine du rein perfusé que dans l'urine du rein témoin, met en évidence une perméabilité notable des cellules tubulaires au potassium (la quantité de radioactivité excrétée par le rein et corrigée pour l'excrétion par le rein témoin représente environ 1 p. 100 de la quantité injectée pendant le même temps). Cette observation est en accord avec les résultats obtenus par Hoshiko et coll. (1956) sur le rein isolé et perfusé de *Rana catesbiana*.

CHAPITRE V

ACTION DE DOUZE ANALOGUES DE LA VASOTOCINE SUR L'EXCRÉTION DE L'EAU ET DES ÉLECTROLYTES PAR LE REIN DE LA GRENOUILLE

Dans ce chapitre, nous présentons les résultats obtenus avec les autres peptides neurohypophysaires naturels des Vertébrés : l'ocytocine, la vasopressine, la mésotocine (8-isoleucine-ocytocine) et l'isotocine (4-sérine-8-isoleucine-ocytocine). Nous décrivons également les actions produites par la déamino-ocytocine, la 3-leucine-ocytocine, la 3-valine-ocytocine, la 3-phénylalanine-ocytocine, la 5-glutamine-ocytocine, la 7-dé-proline-ocytocine, la 8-dé-leucine-ocytocine et la 2-3-phénylalanine-8 lysine-ocytocine, analogues de structure de ces hormones.

Cette étude a été réalisée dans des conditions identiques à celles employées pour l'étude des actions de la vasotocine (deuxième partie, chapitre II) sur des grenouilles préparées de manière chronique et maintenues dans de l'eau courante depuis la fin de l'opération. Les modifications de l'excrétion de l'eau et des électrolytes produites par l'injection intravasculaire de ces peptides ont été recherchées en mesurant le débit urinaire, la clearance de l'inuline, la clearance osmotique et les clearances de l'eau libre du sodium et du potassium au cours d'une série de périodes successives de collection des urines.

A. Actions de l'ocytocine et de la lysine-vasopressine.

Les actions de l'ocytocine ont été recherchées sur une série de 21 animaux. La fig. 17 montre sur un exemple particulier que l'injection de 0,55 µg d'ocytocine dans l'artère iliaque produit un effet antidiurétique discret accompagné d'une faible diminution de la filtration glomérulaire mais ne modifie pas la composition de l'urine émise par le rein, dont la pression osmotique et la concentration en sodium et en potassium restent constantes. Les faibles variations de la clearance osmotique et des clearances de l'eau libre du sodium et du potassium résultent entièrement de la baisse de la filtration glomérulaire ; en effet, les clearances relatives C_{H_2O}/C_{in}, C_{NA}/C_{in}, C_{osm}/C_{in} et C_K/C_{in} ne sont pas modifiées sous l'action de l'hormone.

Le tableau IX donne les valeurs moyennes du pourcentage de variation du débit urinaire, de la clearance de l'inuline et des clearances relatives C_{H_2O}/C_{in},

C_{NA}/C_{in}, C_{osm}/C_{in} et C_K/C_{in}, calculées à partir de l'ensemble de nos données expérimentales.

On observe que, parmi ces grandeurs, seuls le débit urinaire et la filtration glomérulaire sont diminués de manière significative par l'hormone. Même pour

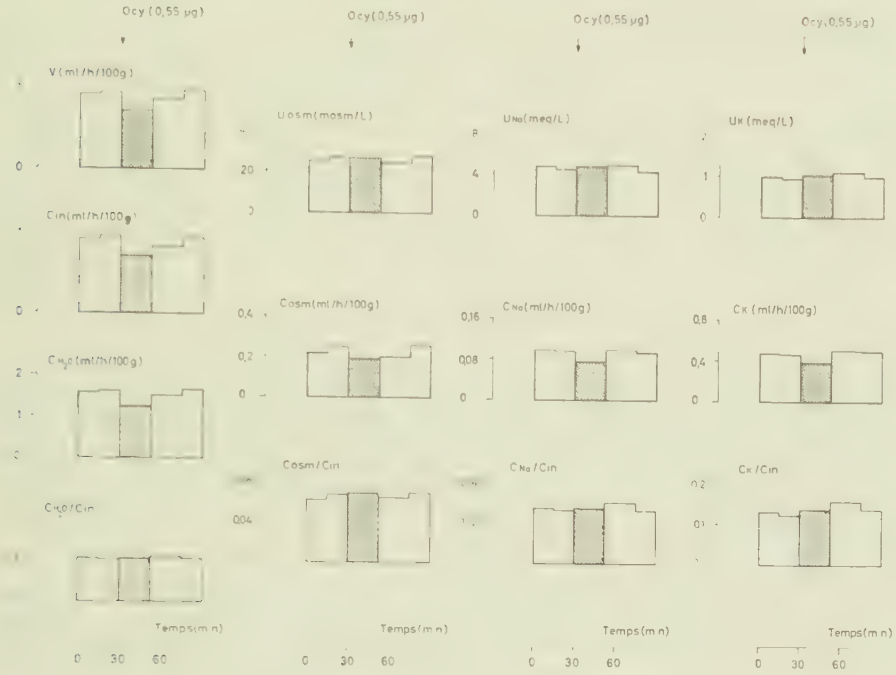


FIG. 17. — Action de l'ocytocine sur l'excrétion de l'eau et des électrolytes par le rein de la Grenouille.

Expérience du 7-2-1961. Grenouille, poids : 70 g, opérée le 6-2-1961.

En abscisses, le temps en mn. En ordonnées, le débit urinaire (V), la clearance de l'inuline (C_{in}), la pression osmotique (U_{osm}), la concentration du sodium (U_{NA}) et du potassium (U_K) dans l'urine, la clearance osmotique (C_{osm}), les clearances de l'eau libre (C_{H_2O}) du sodium (C_{NA}) et du potassium (C_K), et les clearances relatives correspondantes (C_{osm}/C_{in}, C_{H_2O}/C_{in}, C_{NA}/C_{in}, C_K/C_{in}. La flèche indique l'injection dans l'artère iliaque de 0,55 µg d'ocytocine. Commentaires dans le texte.

les doses les plus élevées que nous avons employées (4 µg / 100 g de poids corporel) et qui sont de l'ordre de 1 000 fois supérieures aux doses actives de vasotocine, l'ocytocine ne produit pas les effets tubulaires caractéristiques de l'hormone naturelle : augmentation de la réabsorption d'eau libre et de sodium.

La lysine-vasopressine, même administrée en fortes doses (jusqu'à 4 µg/100 g de poids corporel), est complètement dépourvue d'activité biologique sur le rein de la Grenouille comme le montrent la fig. 18 qui illustre les résultats d'une expérience caractéristique et le tableau X qui résume l'ensemble des données expérimentales obtenues (10 expériences).

TABLEAU IX. — *Actions de l'ocytocine : résultats d'ensemble.*

	Moyenne	Nombre de mesures	Intervalle de confiance	Comparaison à o	
				t	P
Dose (µg/100 g).....	0,525	21	—	—	—
Pourcentage de variation de : V.....	25,7	21	± 8,6	6,245	*P < 0,001
C_{in}.....	14,8	21	± 7,3	4,217	*P < 0,001
C_{H_2O}/C_{in}.....	5,9	21	± 8,9	1,388	0,1 < P < 0,2
C_{Na}/C_{in}.....	— 0,7	21	± 11,9	0,122	0,9 < P
C_{osm}/C_{in}.....	— 1	21	± 9,4	0,210	0,8 < P < 0,9
C_K/C_{in}.....	— 0,9	21	± 10,0	0,188	0,8 < P < 0,9

Abréviations : voir figure 17.

Les résultats individuels ont été calculés en rapportant les valeurs des différents paramètres mesurées pendant l'action de l'ocytocine aux valeurs correspondantes mesurées au cours de la période témoin précédant immédiatement l'injection. Le pourcentage de variation a été considéré comme positif dans le cas d'une diminution et comme négatif dans le cas d'une augmentation. L'absence de variation significative des clearances relatives C_{H_2O}/C_{in} et C_{Na}/C_{in} indique que l'ocytocine est dépourvue d'action sur les processus de réabsorption tubulaire d'eau libre et de sodium. L'effet antidiurétique significatif résultant entièrement d'une faible diminution de la filtration glomérulaire. L'intervalle de confiance a été calculé au seuil de probabilité de 0,05.

TABLEAU X. — *Actions de la lysine-vasopressine : résultats d'ensemble.*

	Moyenne	Nombre de mesures	Intervalle de confiance	Comparaison à o	
				t	P
Dose (µg/100 g).....	0,891	10	—	—	—
Pourcentage de variation de : V.....	— 2,2	10	± 12,8	0,387	P # 0,7
C_{in}.....	1,9	10	± 13,1	0,327	0,7 < P < 0,8
C_{H_2O}/C_{in}.....	— 0,8	10	± 8,1	0,222	0,8 < P < 0,9
C_{Na}/C_{in}.....	— 0,2	10	± 15,1	0,033	0,9 < P
C_{osm}/C_{in}.....	0,3	10	± 10,2	0,073	0,9 < P
C_K/C_{in}.....	— 2,4	10	± 14,2	0,381	P # 0,7

Légende : voir tableau IX.

B. Actions de l'isotocine et de la mésotocine.

La mésotocine (8-isoleucine-ocytocine) et l'isotocine (4-sérine-8-isoleucine-ocytocine) sont, à faibles doses, sans action biologique sur le rein de la Grenouille. A doses élevées, ces deux peptides produisent des modifications de l'excrétion

FIG. 18. — Actions de la lysine-vasopressine sur l'excrétion de l'eau et des électrolytes par le rein de la Grenouille.

Expérience du 14-5-1961. Grenouille, poids : 80 g, opérée le 12-5-1961.

Légende : voir fig. 17.

On remarquera que la lysine-vasopressine est dépourvue d'activité biologique sur le rein de la Grenouille.

hydrominérale de nature et d'intensité comparables que nous analysons sur un exemple particulier avant de présenter l'ensemble de nos résultats.

La fig. 19 présente les résultats d'une expérience caractéristique. On observe que l'injection de 0,35 µg de mésotocine dans l'artère iliaque produit un effet diurétique et une augmentation marquée du taux de filtration glomérulaire et de l'excrétion des électrolytes (augmentation des clearances C_{in}, C_{Na} et C_K). Sous l'action de l'hormone, la concentration du sodium et du potassium dans l'urine est augmentée et la pression osmotique urinaire accrue. L'accroissement des clearances relatives C_{Na}/C_{in} et C_K/C_{in} indique que la fraction du sodium et du potassium filtrés qui se trouve excrétée dans l'urine définitive est augmentée. Ces résultats montrent que la mésotocine diminue l'efficacité relative des processus de réabsorption tubulaire des électrolytes. En revanche, l'intensité relative de la réabsorption d'eau n'est pas modifiée ; en effet, le rapport des concentrations urinaire et plasmatique d'inuline n'est pas affecté par l'injection d'hormone. La faible diminution de la clearance relative de l'eau libre que produit la mésotocine ne résulte donc pas — comme dans le cas des injections de vasotocine — d'une augmentation de la réabsorption tubulaire d'eau en excès par rapport à

celle des solutes. Elle est la conséquence indirecte d'une diminution de l'intensité relative des processus de réabsorption tubulaire du sodium et du potassium. Dans de telles conditions, la clearance osmotique relative est augmentée alors qu'elle n'est pas modifiée par l'injection de vasotocine. La diminution de l'efficacité relative de la réabsorption tubulaire des électrolytes n'implique pas une action inhibitrice directe de l'hormone. Elle traduit vraisemblablement la saturation des processus de réabsorption du sodium et du potassium résultant d'une augmentation importante du débit d'électrolytes délivrés à l'entrée des tubules urinaires. Dans cette hypothèse, une action unique de la mésotocine sur l'intensité de la filtration glomérulaire permettrait de rendre compte de l'ensemble des effets observés.

FIG. 19. — Actions de la mésotocine (8-isoleucine-ocytocine) sur l'excrétion de l'eau et des électrolytes par le rein de la Grenouille.
Expérience du 15-6-1961. Grenouille : poids 100 g, opérée le 12-6-1961.
Légende : voir fig. 17. La flèche indique l'injection dans l'artère iliaque de 0,35 µg de mésotocine (Ileu^8-ocy).
Commentaires dans le texte.

Le tableau XI résume l'ensemble des résultats obtenus. On remarquera que l'injection de fortes doses de mésotocine (dose moyenne 0,62 µg/100 g) ou d'isotocine (dose moyenne : 2 µg) produit une augmentation significative du taux de filtration glomérulaire, du débit urinaire, de la concentration des élec-

trolytes et de la pression osmotique de l'urine et entraîne une faible diminution de la clearance relative de l'eau libre.

TABLEAU XI. — *Actions de la mésotocine et de l'isotocine sur l'excrétion hydrominérale par le rein de la Grenouille.*

C_{in}	ΔC_{in}	V	ΔV	U_{Na}	ΔU_{Na}	U_K	ΔU_K	U_{osm}	ΔU_{osm}	baisse C_{H_2O}/C_{in} (en %)
(ml/h/100 g)		(ml/h/100 g)		(mEq/l)		(mEq/l)		(mOsm/l)		
Mésotocine : 8-isoleucine-ocytocine (14 expériences). Dose moyenne : 0,62 µg/100 g										
4,98 ± 0,95	2,52 ± 1,33	2,37 ± 0,58	0,99 ± 0,64	4,35 ± 1,91	13,45 ± 4,43	1,18 ± 0,63	1,08 ± 0,38	23 ± 4	24 ± 5	9,2 ± 6,7
Isotocine : 4-sérine-8-isoleucine-ocytocine (5 expériences). Dose moyenne : 2,0 µg/100 g										
4,19 ± 1,13	2,09 ± 1,50	2,49 ± 0,74	1,22 ± 1,11	5,75 ± 4,66	5,12 ± 3,58	1,53 ± 0,75	1,01 ± 0,33	26 ± 8	17 ± 15	8,6 ± 4,8

Le tableau indique les valeurs moyennes du taux de filtration glomérulaire (C_{in}), du débit urinaire (V), de la concentration du sodium (U_{Na}) et du potassium (U_K) dans l'urine ainsi que la pression osmotique urinaire (U_{osm}) mesurés avant l'injection de mésotocine ou d'isotocine. Chaque moyenne est accompagnée de son intervalle de confiance au seuil de probabilité de 0,05. ΔC_{in}, ΔV, ΔU_{Na}, ΔU_K, ΔU_{osm}, représentent les moyennes des différences calculées pour chaque expérience entre les valeurs de ces grandeurs mesurées après et avant l'injection d'hormone. Chacune de ces moyennes diffère significativement de 0 au seuil de probabilité de 0,05 (la valeur nulle n'étant comprise dans aucun des intervalles de confiance dont les valeurs sont indiquées sous chaque moyenne).

La dernière colonne indique la moyenne de la baisse de la clearance relative de l'eau libre exprimée en p. 100 des valeurs témoins.

C. Actions de huit analogues de structure de la vasotocine.

Comme le montre le tableau XII, la déamino-ocytocine, la 3-leucine-ocytocine, la 3-valine-ocytocine, la 3-phénylalanine-ocytocine, la 5-glutamine-ocytocine, la 7-dé-proline-ocytocine, la 8-dé-leucine-ocytocine et la 2-3 phénylalanine-8-lysine-ocytocine injectées à fortes doses (de 10 à 1 000 fois plus élevées que les doses actives de vasotocine) produisent tous une augmentation de la filtration glomérulaire, un effet diurétique, natriurique et kaliurique d'intensité relative variable d'un peptide à l'autre, mais dans tous les cas très significative.

D. Interprétation et discussion.

Les résultats présentés dans ce chapitre mettent en évidence la très grande spécificité de l'action de la vasotocine sur le rein de la Grenouille ; en effet, aucun des nonapeptides étudiés, qu'il s'agisse des hormones neurohypophysaires des Mammifères et des Vertébrés inférieurs ou d'analogues artificiels de structure voisine,

TABLEAU XII. — *Actions de huit analogues de structure de la vasotocine sur l'excrétion hydrominérale par le rein de la Grenouille.*

C_{in}	ΔC_{in}	V	ΔV	U_{Na}	ΔU_{Na}	U_K	ΔU_K	U_{osm}	ΔU_{osm}	baisse C_{H_2O}/C_{in} (en %)
(ml/h/100 g)		(ml/h/100 g)		(mEq/l)		(mEq/l)		(m Osm/l)		
Déamino-ocytocine (10 expériences) Dose moyenne : 2,3 µg/100 g										
3,51	1,39	2,80	1,39	3,12	10,13	0,45	0,68	16,4	24,0	13,9
±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
0,88	0,86	0,76	0,90	0,36	4,93	0,14	0,52	2,5	9,2	8,7
3-leucine-ocytocine (4 expériences) Dose moyenne : 1,68 µg/100 g										
6,27	0,72	4,09	0,29	2,58	3,18	1,53	0,10	16,5	6,3	3,5
±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
4,04	1,17	1,66	0,32	1,71	6,33	0,48	0,64	6,5	2,4	3,1
3-valine-ocytocine (11 expériences) Dose moyenne : 1,46 µg/100 g										
3,45	0,50	2,71	0,80	5,90	5,76	1,10	1,31	29,7	10,8	6,2
±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
0,86	0,55	0,69	0,55	2,04	3,82	0,27	0,88	8,5	6,4	4,3
3-phénylalanine-ocytocine (6 expériences) Dose moyenne : 1,84 µg/100 g										
2,75	1,56	2,05	1,90	3,06	8,35	1,73	0,28	19,3	11,5	3
±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
1,08	0,77	0,93	1,01	1,48	5,81	0,60	0,58	2,7	11,0	2,8
5-glutamine-ocytocine (5 expériences) Dose moyenne : 2,0 µg/100 g										
5,10	0,53	3,06	0,42	4,26	3,20	0,94	0,32	24,5	7,0	4,3
±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
1,06	0,42	0,98	0,38	0,79	1,70	0,12	0,30	4,6	5,1	4,1
7-dé-proline-ocytocine (5 expériences) Dose moyenne : 2,5 µg/100 g										
4,80	0,48	2,27	0,30	4,08	2,05	1,06	0,53	28,3	4,2	6,4
±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
1,22	0,38	1,10	0,22	0,68	1,31	0,28	0,48	5,0	3,6	5,3
8-dé-leucine-ocytocine (5 expériences) Dose moyenne : 1,5 µg/100 g										
4,15	0,86	2,32	0,53	3,82	0,92	1,16	0,48	30,2	3,0	8,0
±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
0,91	0,72	0,86	0,42	0,91	0,75	0,36	0,36	6,1	2,7	9,2
2-3-phénylalanine-ocytocine (13 expériences) Dose moyenne : 7,67 µg/100 g										
5,89	1,40	2,42	0,93	4,23	4,46	0,99	0,236	25,7	6,7	6,0
±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
2,13	1,23	0,61	0,49	1,72	3,79	0,56	0,32	3,5	5,6	5

Légende : voir tableau XI. On remarquera que les huit analogues étudiés produisent tous des effets pharmacologiques comparables aux actions de la mésotocine et de l'isotocine.

ne produit les effets tubulaires caractéristiques de l'hormone naturelle (augmentation de la réabsorption d'eau libre et de sodium). Toutefois, seule la lysine-vasopressine est, parmi les produits utilisés, complètement dépourvue d'activité biologique ; les autres peptides, administrés en fortes doses à la Grenouille,

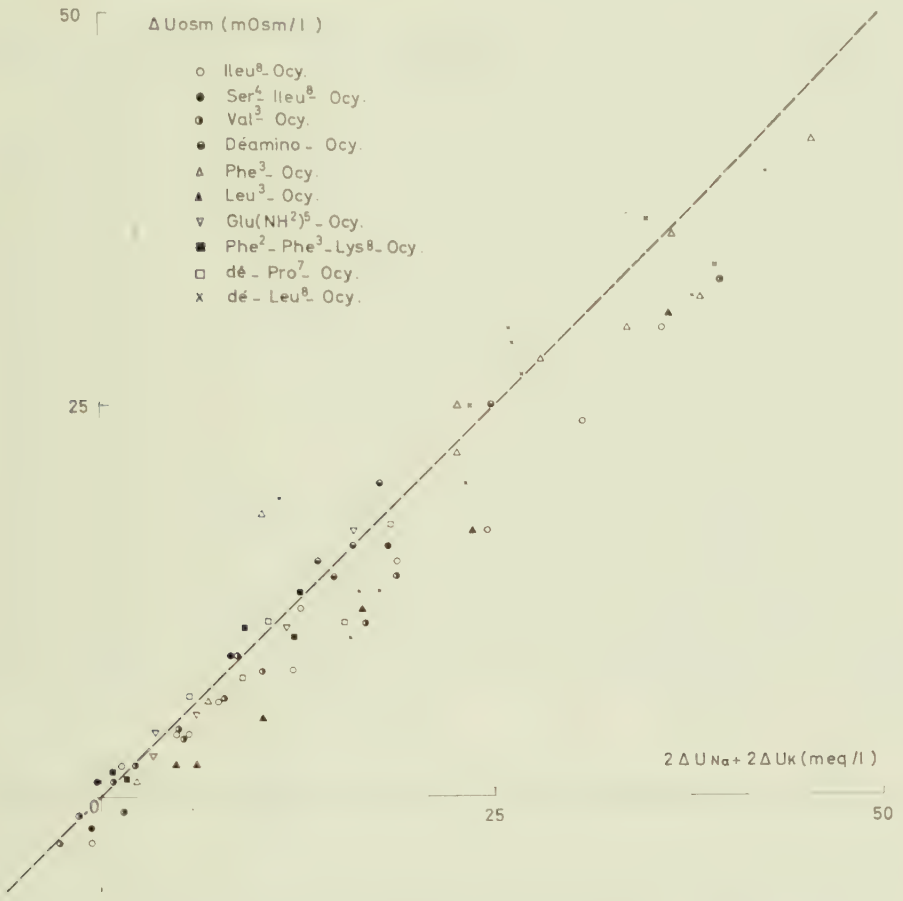


FIG. 20. — Actions de dix analogues de structure de la vasotocine : corrélation entre l'accroissement de la pression osmotique et l'augmentation de la concentration du sodium et du potassium dans l'urine.

En abscisses : la somme des augmentations, par rapport à la période témoin précédant l'injection, de la concentration du sodium et du potassium dans l'urine exprimée en mEq/l et doublée pour tenir compte des anions accompagnant.

En ordonnées : l'augmentation correspondante de la pression osmotique urinaire en mOsm/l.

La droite tracée en pointillés, indique la première bissectrice.

produisent des modifications de l'excrétion hydrominérale de nature variable et d'origine vraisemblablement purement pharmacologique :

L'ocytocine, d'une part, produit un effet antidiurétique discret et une diminution du taux de filtration glomérulaire. Toutefois, ni la composition de l'urine définitive, ni l'intensité relative de la réabsorption tubulaire d'eau libre de sodium

et de potassium ne sont modifiées sous l'action de l'hormone. Il est vraisemblable que la baisse du taux de filtration glomérulaire produite par l'ocytocine traduit une diminution de la masse de tissu tubulaire actif ; elle résulterait donc, comme dans le cas de l'action de la vasotocine, d'une diminution du nombre des glomérules fonctionnels.

La mésotocine, l'isotocine et l'ensemble des analogues étudiés, d'autre part, produisent une augmentation du débit urinaire et du taux de filtration glomérulaire s'accompagnant d'effets natriurique et kaliurique marqués.

Une action unique de ces peptides sur le taux de filtration glomérulaire permet de rendre compte de l'ensemble des faits observés dans l'hypothèse où la hausse de la clearance de l'inuline résulte, dans ce cas, d'une augmentation du débit de filtration pour l'ensemble des néphrons fonctionnels :

1° L'augmentation du débit de solutes à l'entrée de chaque néphron, pourrait conduire à une saturation des processus de réabsorption tubulaire et ainsi rendre compte de l'augmentation des concentrations du sodium et du potassium dans l'urine définitive. En effet, malgré une excrétion accrue, la quantité absolue d'électrolytes réabsorbés par le rein n'est pas diminuée sous l'action de ces hormones.

2° Comme le montre la fig. 20, l'augmentation de la concentration des électrolytes dans l'urine suffit à expliquer l'accroissement de la pression osmotique urinaire. De plus, le rapport des concentrations plasmatique et urinaire de l'inuline n'est pas modifié. L'augmentation du taux de filtration glomérulaire et l'accroissement de la concentration du sodium et du potassium dans l'urine permettent donc de rendre compte des modifications observées de la clearance osmotique, de la clearance de l'eau libre et des clearances relatives correspondantes.

DISCUSSION ET CONCLUSION DE LA PREMIÈRE PARTIE

Arrivé au terme de l'exposé des données expérimentales recueillies au cours de cette première partie de notre travail, nous nous proposons de résumer brièvement les résultats obtenus et de présenter une discussion critique des interprétations proposées. Notre exposé sera orienté successivement sur la discussion des principaux problèmes suivants :

— étude des relations éventuelles entre l'effet glomérulaire et les deux effets tubulaires de la vasotocine sur le rein de la Grenouille ;

— analyse des mécanismes impliqués dans l'action de la vasotocine sur les cellules tubulaires ;

— rôle physiologique éventuel de cette hormone dans la régulation de la balance hydrominérale chez les Amphibiens ;

— comparaison des actions des hormones neurohypophysaires sur le rein des différents groupes de Vertébrés ;

— études des corrélations existant entre la structure moléculaire et l'activité biologique d'une série d'analogues de structure des hormones neurohypophysaires sur le rein de la Grenouille.

Relations entre l'effet glomérulaire et les deux actions tubulaires de la vasotocine sur le rein de la Grenouille.

L'injection de vasotocine à la Grenouille produit une augmentation marquée de la réabsorption tubulaire d'eau libre et de sodium, mais, comme nous l'avons déjà signalé, ces résultats ne suffisent pas à démontrer l'existence d'une action tubulaire directe de l'hormone ; ils pourraient être la conséquence indirecte de la baisse de la filtration glomérulaire très généralement observée dans nos conditions expérimentales. Ainsi, il a été montré chez les Mammifères que lorsqu'on réduit le débit urinaire au cours d'une diurèse osmotique par constriction de l'artère rénale (Berliner et Davidson, 1957) ou des voies urinaires (Abbrecht et Malvin, 1960), l'accroissement du temps de contact de l'urine primitive avec les cellules tubulaires, entraîne une augmentation de la réabsorption tubulaire d'eau ; la pression osmotique de l'urine s'élève et celle-ci peut devenir faiblement hypertonique, même en l'absence d'hormone antidiurétique. Néanmoins, plusieurs arguments expérimentaux recueillis au cours de ce travail permettent d'exclure l'existence d'un tel mécanisme chez la Grenouille :

1° la diminution de la capacité maximum de réabsorption du glucose par le rein observée sous l'action de la vasotocine montre que la baisse de la filtration glomérulaire produite par l'hormone résulte entièrement d'une diminution du nombre de glomérules fonctionnels. Pour l'ensemble des néphrons en activité, le débit de filtration par glomérule et par conséquent le temps de contact de l'urine primitive avec les cellules tubulaires n'est pas modifié ;

2° il n'existe pas de corrélation significative entre la baisse de la filtration glomérulaire et l'intensité de l'un ou de l'autre des effets tubulaires de la vasotocine ;

3° l'ocytocine produit une diminution de la filtration glomérulaire sans augmentation associée de la réabsorption tubulaire d'eau libre ou de sodium ;

4° enfin, comme nous le montrerons dans la troisième partie de notre exposé, l'ocytocine inhibe complètement les deux actions tubulaires de la vasotocine mais ne modifie pas la baisse de la filtration glomérulaire qui leur est normalement associée.

Nature des mécanismes impliqués dans l'action de la vasotocine sur le tubule urinaire de la Grenouille.

Comme le suggèrent les expériences décrites au chapitre IV, il est vraisemblable que l'action tubulaire des hormones neurohypophysaires chez la Grenouille est localisée, comme chez les Mammifères (Wirz, 1956, 1957) au tubule distal des néphrons. A ce niveau, l'urine est toujours hypoosmotique par rapport au plasma comme Walker et coll. (1937) l'ont montré chez *Necturus* par analyse directe du fluide intratubulaire. La stimulation de la réabsorption tubulaire d'eau libre résulte vraisemblablement d'une augmentation par l'hormone du coefficient de perméabilité osmotique pour l'eau des cellules tubulaires telle qu'elle a été démontrée sur la peau (Fuhrman et Ussing, 1951 ; Ussing, 1954 *a*, *b* ; Morel et coll., 1958) et la vessie (Sawyer et Schisgall, 1956 ; Leaf et coll., 1958) des Amphibiens et dans le cas du tubule distal du rein des Mammifères (Wirz, 1956, 1957). Signalons toutefois que, dans nos conditions expérimentales, la pression osmotique de l'urine définitive augmentée sous l'action de la vasotocine, reste toujours inférieure à la pression osmotique du plasma. L'absence d'équilibration osmotique entre le plasma et l'urine pourrait s'expliquer soit par une action de la vasotocine localisée à une zone très courte des néphrons, soit par une réabsorption importante de solutes s'opérant dans un segment distal par rapport au site d'action de l'hormone et relativement imperméable à l'eau.

La baisse de la pression osmotique de l'urine intratubulaire le long du tubule distal des néphrons chez la Grenouille est la conséquence d'une réabsorption importante de sodium (Walker et coll., 1937) s'opérant contre un gradient de concentration élevée (la concentration du sodium dans l'urine définitive pouvant atteindre des valeurs jusqu'à 100 fois plus faibles que la concentration plasmatique) et contre un gradient électrique, la face intraluminale des cellules tubulaires étant électronégative (Giebisch, 1958) ; elle présente donc les caractères d'un transport actif. La diminution importante de la clearance relative du sodium sous

l'influence de la vasotocine résulte vraisemblablement d'une stimulation par l'hormone de ce système de réabsorption active.

Ainsi, il est remarquable de constater que la vasotocine produit sur le tubule urinaire de la Grenouille une double action : stimulation du transport actif du sodium et augmentation de la perméabilité osmotique pour l'eau, identique à celle décrite sur les autres récepteurs de l'osmorégulation chez cette espèce : la peau et la vessie. Sur ces deux structures, l'augmentation du coefficient de perméabilité osmotique pour l'eau serait équivalent, sur le plan physico-chimique, à l'ouverture de pores dans la membrane cellulaire (Ussing, 1954 *a* ; Andersen et Ussing, 1957). Les expériences de Whittenbury et coll. (1960), suggèrent un mécanisme d'action analogue sur les cellules tubulaires du rein ; chez *Necturus*, le diamètre apparent des pores passerait de 11,2 à 13 Å.

Quant au mode d'action des hormones neurohypophysaires sur le transport actif de sodium par la peau ou la vessie des Amphibiens, deux hypothèses principales ont été proposées : la première, suggérée par Leaf (1960) et par Ussing (1960), fait intervenir ces peptides sur un récepteur localisé à la membrane muqueuse des cellules épithéliales, leur action se traduirait par une augmentation de la perméabilité passive au sodium ; elle conduirait à une augmentation de la concentration intracellulaire du sodium et entraînerait, de ce fait, une stimulation indirecte de la composante active du transport localisée à la face séreuse des cellules épithéliales. Une action unique des peptides neurohypophysaires sur la perméabilité passive à l'eau et au sodium de la membrane muqueuse rendrait compte de l'ensemble des effets observés.

L'autre hypothèse, au contraire, fait intervenir ces hormones sur deux récepteurs cellulaires distincts : leur action se traduirait non seulement par une augmentation de la perméabilité à l'eau et au sodium de la membrane muqueuse, mais également par une stimulation directe de la composante active du transport de sodium. Elle repose sur la mise en évidence (Bourguet et Maetz, 1961) d'une dissociation des deux actions des hormones neurohypophysaires sur la peau et la vessie de la Grenouille. En mesurant les activités de différents peptides, ces auteurs ont montré que des doses d'arginine-vasotocine produisant une stimulation donnée du transport actif de sodium augmentent la perméabilité à l'eau de manière beaucoup plus marquée que les doses de lysine-vasotocine ou d'ocytocine produisant une action comparable sur le transport actif de sodium. Plus récemment, Morel et Bastide (1965) ont montré que l'ocytocine stimule la composante active du transport de sodium par la peau de Grenouille. En se plaçant dans une situation expérimentale telle que le flux net traversant la préparation soit négatif, c'est-à-dire dirigé de la face séreuse vers la face muqueuse des cellules épithéliales, ces auteurs ont montré que sous l'action de l'ocytocine le flux net augmente (il devient moins négatif et peut même s'inverser) alors que, dans ces conditions, une augmentation par l'hormone de la perméabilité passive au sodium de la membrane muqueuse devrait conduire, au contraire, à une diminution du flux net de sodium traversant la peau.

Dans le cas du tubule urinaire, aucun argument expérimental direct ne permet

de dissocier ni spatialement, ni fonctionnellement, les deux actions de la vasotocine sur la réabsorption d'eau libre et de sodium. Tant dans le cas de l'arginine que dans celui de la lysine-vasotocine, ces deux effets sont toujours associés et d'intensité comparable. De plus, pour un effet donné sur la réabsorption tubulaire d'eau libre, ces deux peptides produisent une stimulation comparable de la réabsorption active du sodium.

Rôle physiologique de la vasotocine dans la régulation du métabolisme hydrominéral chez la Grenouille.

Le rôle physiologique d'une hormone dans un mécanisme régulateur est, dans la plupart des cas, difficile à démontrer ; en effet, la mesure de la concentration de l'hormone circulante et l'étude de ses variations en fonction de l'activité des organes effecteurs périphériques ou des stimuli spécifiques susceptibles de modifier le taux de sécrétion de la glande qui la produit, ne sont pas, en général, directement accessibles. Les arguments indirects le plus souvent retenus sont d'ordre négatif ; en premier lieu, l'ordre de grandeur des doses actives doit être compatible avec le contenu en hormone de la glande productrice et, dans tous les cas, très faible, en second lieu, la nature même et l'intensité des effets observés doit effectivement permettre de rendre compte du rôle régulateur présumé. Considérés de ce double point de vue, les résultats présentés dans ce chapitre militent en faveur du rôle physiologique probable de la vasotocine dans la régulation du métabolisme hydrominéral chez la Grenouille. D'une part, les doses actives qui correspondraient à une concentration dans le sang circulant de l'ordre de 10^{-11} M ne représentent qu'une faible fraction (de 0,1 p. 100 à 1 p. 100) du contenu total de la neurohypophyse. D'autre part, les actions de la vasotocine sur le rein, la peau et la vessie, en limitant les pertes d'eau et de sodium par l'ensemble de l'organisme, pourraient contribuer à la régulation du volume et de la pression osmotique des liquides extracellulaires chez la Grenouille dans les cas où l'animal se trouve exposé à une déshydratation modérée, pendant les périodes de vie aérienne en particulier. Néanmoins, les variations de l'excrétion de l'eau et des électrolytes observées chez la Grenouille résultent, pour une large part, de modifications importantes du taux de filtration glomérulaire, s'opérant vraisemblablement par des variations du nombre de glomérules fonctionnels (voir première partie, chapitre premier). De ce point de vue, la signification physiologique de la baisse du taux de filtration glomérulaire produite par la vasotocine n'est pas à écarter.

Par contre, le rôle physiologique de la mésotocine, hormone naturelle chez la Grenouille, est plus difficile à définir. A faibles doses, ce peptide est sans activité biologique sur le rein alors qu'il présente une activité du même ordre de grandeur que celle de la vasotocine sur le transport actif de sodium par la peau (Morel et Bastide, 1964) ou la perméabilisation à l'eau de la vessie (Rasmussen et coll., 1963).

Quant à l'isotocine, elle ne présente qu'une activité biologique très faible sur l'ensemble des organes effecteurs de l'osmorégulation et, de ce fait, ne semble

pas impliquée dans la régulation du métabolisme hydrominéral chez les Vertébrés inférieurs.

Comparaison des actions de la vasotocine chez la Grenouille avec les actions des hormones neurohypophysaires sur le rein des différents groupes de Vertébrés.

Du point de vue de la Physiologie comparée, l'action des hormones neurohypophysaires sur le tubule rénal chez les Amphibiens anoures mérite de retenir l'attention ; il semble, en effet, que cette action soit liée à l'acquisition de l'habitat terrestre. Chez les Poissons, la vasotocine et l'isotocine hormones, naturelles dans ce groupe, les extraits neurohypophysaires bruts, ou les hormones des Mammifères, ne produisent qu'un effet diurétique résultant d'une augmentation de la filtration glomérulaire sans modification associée des processus de réabsorption tubulaire de l'eau ou des électrolytes (Maetz, 1963 ; Maetz et coll., 1964). Chez les Oiseaux, les hormones neurohypophysaires produisent un effet antidiurétique marqué résultant essentiellement d'une augmentation de la réabsorption tubulaire d'eau libre mais s'accompagnant également, comme chez les Amphibiens, d'une diminution de la filtration glomérulaire. Chez les Mammifères, enfin, seule l'action tubulaire subsiste ; en raison de l'architecture très particulière des régions profondes du rein, elle permet, dans ce seul groupe, l'élaboration d'une urine de pression osmotique supérieure à celle du plasma. Si une action des hormones neurohypophysaires sur la réabsorption tubulaire de l'eau semble commune à l'ensemble des Vertébrés à vie aérienne, une action de ces hormones sur la réabsorption active de sodium par le rein, analogue à celle que nous décrivons chez la Grenouille, n'a été clairement mise en évidence chez aucun autre groupe de Vertébrés. Chez les Mammifères, en particulier, l'hormone antidiurétique injectée au cours de la diurèse aqueuse, ou bien ne modifie pas l'excrétion du sodium, ou bien l'augmente suivant l'espèce considérée et les conditions expérimentales réalisées. Un effet natriurique a été observé avec l'ocytocine (Brooks et Pickford, 1957, 1958) et avec la vasotocine (Sawyer et coll., 1962) chez le Chien et avec plusieurs analogues de l'ocytocine (Barnafi et coll., 1962 ; Rosas et coll., 1962) chez le Rat. Chez cette espèce (Jard et Morel, 1962 ; Morel, 1964) la lysine-vasotocine, la lysine-vasopressine ou l'ocytocine administrées par perfusion continue chez l'animal placé dans des conditions de diurèse aqueuse soigneusement contrôlées affectent l'excrétion du sodium d'une manière très variable d'une expérience à l'autre ; le plus souvent, on observe un effet natriurique très marqué, parfois, et pour des effets antidiurétiques comparables, ces peptides ne produisent aucune modification de l'excrétion du sodium. Toutefois, ces résultats ne permettent pas d'exclure une action directe des hormones neurohypophysaires sur la réabsorption active de sodium par le rein des Mammifères. Morel, 1964, suggère le mécanisme d'action suivant de l'hormone antidiurétique : à part son action bien établie sur la perméabilité osmotique pour l'eau du tubule distal (Wirz, 1956, 1957), l'hormone stimulerait la réabsorption active de sodium hors de la branche ascendante de l'anse de Henle. Cette action, asso-

TABLEAU XIII. — *Activités biologiques des hormones neurohypophysaires et de 9 de leurs analogues de structure.*

Peptide	Activités biologiques chez la Grenouille				Activités de référence		
	Activité natriférique (*R. esculenta* U /mg)	Perméabilisation de la vessie pour l'eau		Activité sur le tubule rénal *R. esculenta* % act. A.V.T.	Activités ocytociques		Activité vasopressique (Rat) UI mg
		R. esculenta U /mg	*B. marinus* % act. A.V.T.		Utérus de Rat UI/mg	Pression artérielle de la Poule UI/mg	
Hormones naturelles :							
Arg^8-ocytocine (vasotocine)	1140 (1)	14.000 (1)	100 (3)	100	75 (4)	150 (4)	125 (4)
$Ileu^8$-ocytocine (mésotocine)	507 (2)		8 (3)	0	289 (5)	498 (5)	6,3 (5)
Ser^4-$Ileu^8$-ocytocine (isotocine)	5,3 (2)		1,6 (3)	0	150 (6)	320 (6)	0,06 (6)
Ocytocine	450	450	4,0 (3)	0	450 (5)	450 (5)	5 (5)
Phe^3-Lys^8-ocytocine (Lysine-vasopressine)	5,4 (2)	12,5 (1)	0,45 (3)	0	5 (5)	40 (5)	270 (5)
Analogues de structure :							
Lys^8-ocytocine (lysine-vasotocine)	940 (1)	1030 (1)	25 (3)	100	78 (5)	270 (5)	130 (5)
Déamino-ocytocine	190 (2)		0,45 (3)	0	684 (9)		
Leu^3-ocytocine	17 (2)		0,16 (3)	0	45 (5)	42 (5)	0,3 (5)
Val^3-ocytocine	49 (2)		0,12 (3)	0	59 (5)	58 (5)	0,2 (5)
Phe^3-ocytocine	1,8 (2)		0,012 (3)	0	20 (7)	30 (7)	3 (7)
Glu $(NH_2)^5$-ocytocine	2,6 (2)			0	1 (10)		
dé-Pro^7-ocytocine	18,3 (2)			0	3,8 (5)	anti (5)	anti (5)
dé-Leu^8-ocytocine	660 (2)			0	4,2 (8)		anti (8)
Phe^{2-3}-Lys^8-ocytocine	1,9 (2)		0,40 (3)	0	0,3 (5)	0,15 (5)	55 (5)

Les activités natritériques (stimulation du transport actif de sodium par la peau isolée de Grenouille) et de perméabilisation à l'eau de la vessie de *Rana esculenta* sont exprimées en unités par milligramme de peptide (U /mg) ; une unité correspondant à l'activité d'une unité internationale d'ocytocine de synthèse Les activités mesurées sur la vessie de *Bufo marinus* et sur le tubule rénal de la Grenouille sont exprimées en p. 100 de l'activité de l'arginine vasotocine (A.V.T.). Les activités de référence (action utérotonique, baisse de la pression artérielle chez la Poule, augmentation de la pression artérielle chez le Rat) sont indiquées en unités internationales par milligramme (UI /mg). Les nombres en parentheses indiquent les références utilisées :

1. JARD et coll. (1960) ; 2. MOREL et BASTIDE (1964) ; 3. RASMUSSEN et coll. (1963) ; 4. KATSOYANNIS et DU VIGNEAUD (1958) ; 5. BOISSONNAS et coll. (1961) ; 6. GUTTMANN (1962) ; 7. KATSOYANNIS (1957) ; 8. JAQUENOUD et BOISSONNAS (1962) ; 9. HOPE et coll. (1962) ; 10. KATSOYANNIS (1957).

Commentaires dans le texte.

ciée à une perméabilité élevée de la branche descendante à la diffusion passive du sodium permettrait une recirculation des solutés dans les régions profondes du rein et contribuerait ainsi à l'établissement du gradient de pression osmotique cortico-papillaire. Dans ces conditions, la quantité de sodium délivrée à la branche ascendante de l'anse de Henle augmenterait. En dépit d'une réabsorption accrue dans ce segment, le débit de sodium à l'entrée du tubule distal pourrait augmenter et rendre compte de l'effet natriurique observé. Chez les Amphibiens, en l'absence d'un système de multiplication par contre-courant, une action de même nature conduirait, par contre, à une baisse de l'excrétion urinaire du sodium.

Corrélations entre structure et activité biologique sur le rein de la Grenouille de onze analogues de la vasotocine.

Parmi l'ensemble des analogues de structure de la vasotocine, hormones naturelles ou peptides artificiels, dont les effets sur le rein de la Grenouille ont été recherchés, seule la lysine-vasotocine qui ne diffère de l'hormone naturelle que par la substitution en position 8 de l'arginine par la lysine, autre acide aminé basique, produit, en doses comparables, les effets caractéristiques de l'arginine-vasotocine : augmentation de la réabsorption tubulaire d'eau libre ou de sodium. Même administrés en quantité 1 000 fois supérieure, les autres peptides étudiés ou bien sont complètement dépourvus d'activité biologique ou bien ne produisent que des modifications de nature purement pharmacologique de l'excrétion hydrominérale. Le rein de la Grenouille présente donc une spécificité de réponse très marquée vis-à-vis de la vasotocine ; un tel degré de spécificité n'a été décrit à notre connaissance sur aucun organe effecteur des hormones neurohypophysaires. Ces particularités du récepteur rénal chez la Grenouille apparaissent nettement dans le tableau XIII où nous rappelons, à titre indicatif, les activités des produits utilisés mesurées sur les principaux organes effecteurs des Amphibiens et des Mammifères. Signalons, enfin, que cette spécificité du récepteur rénal chez les Amphibiens, très stricte chez *Rana esculenta*, est relativement moins marquée chez *Bufo marinus* et *Rana cateshiana*. Chez ces deux dernières espèces, en effet, la lysine-vasopressine et l'ocytocine produisent à fortes doses, un effet antidiurétique caractéristique (Sawyer et Sawyer, 1952 ; Sawyer, 1957 *a*, *b* ; Uranga et Sawyer, 1960).

DEUXIÈME PARTIE

ÉTUDE DES PREMIÈRES ÉTAPES DU MÉCANISME D'ACTION DE LA VASOTOCINE SUR LE REIN DE LA GRENOUILLE

INTRODUCTION

Il est vraisemblable que l'action biologique finale des hormones neurohypophysaires implique une ou plusieurs interactions moléculaires entre l'hormone et un récepteur spécifique de l'organe effecteur, interactions liées à la présence de caractères structuraux particuliers de la molécule hormonale et des molécules réceptrices. La mesure de l'activité biologique de peptides artificiels ne différant de l'hormone naturelle que par des modifications locales dans la séquence ou la composition de la chaîne peptidique n'a pas permis, malgré l'importance des moyens mis en œuvre (plus de 150 analogues ont été étudiés) de mettre en évidence, dans la molécule d'hormone, l'existence d'un ou de plusieurs sites spatialement délimités ou chimiquement définis et directement impliqués dans l'action biologique finale ; en effet, aucun des groupements chimiquement réactifs de la molécule d'hormone ne semble strictement indispensable à l'activité biologique, et des modifications introduites en un point quelconque de la chaîne peptidique sont susceptibles de l'affecter de manière le plus souvent imprévisible (voir par exemple les revues récentes de Boissonnas et coll., 1961, et de Schwartz et Livingston, 1964). Toutefois, il n'est pas exclu que l'existence d'interactions multiples liées chacune à l'existence de facteurs stériques différents mais toutes indispensables à la réalisation de l'effet biologique final, puisse rendre compte des difficultés rencontrées dans l'interprétation des corrélations mises en évidence entre l'activité biologique globale et la structure primaire des hormones neurohypophysaires et de leurs analogues. Si tel est le cas, et si en particulier des analogues partiellement ou totalement inactifs sont susceptibles de former certaines des liaisons de l'hormone naturelle avec son récepteur, des phénomènes d'inhibition compétitive entre peptides neurohypophysaires pourraient être mis en évidence. Inversement, la mise en évidence de tels phénomènes et l'analyse de corrélations éventuelles entre la structure primaire et les propriétés inhibitrices d'une série d'analogues, pourraient permettre de définir plus commodément les caractères structuraux requis pour les différentes étapes du mécanisme d'action des hormones neurohypophysaires. Comme nous l'indiquions en terminant l'exposé de la première partie de notre travail, le rein de la Grenouille, qui présente une spécificité de réponse très marquée vis-à-vis de deux peptides seulement, l'arginine- et la lysine-vasotocine, constitue, par rapport aux autres organes effecteurs généralement étudiés, un cas particulièrement favorable à la poursuite d'une telle étude.

Dans le but d'aborder indirectement l'étude des premières étapes du mécanisme d'action de la vasotocine sur le rein de la Grenouille, nous avons recherché de manière systématique, sur ce récepteur, d'éventuelles interactions entre l'hormone naturelle et 12 de ses analogues de structure dépourvus d'activité biologique propre.

Après avoir décrit qualitativement les résultats obtenus avec l'ocytocine et la lysine-vasopressine puis défini les principaux caractères de l'inhibition observée, nous analyserons l'ensemble des données recueillies avec l'isotocine, la mésotocine et huit peptides artificiels, analogues de structure de la vasotocine.

CHAPITRE PREMIER

MISE EN ÉVIDENCE DE L'INHIBITION PAR L'OCYTOCINE DES ACTIONS TUBULAIRES DE LA VASOTOCINE SUR LE REIN DE LA GRENOUILLE

Dans la série d'expériences que nous décrivons dans ce chapitre, nous avons recherché l'inhibition par l'ocytocine et la lysine-vasopressine des actions de la vasotocine sur le rein de la Grenouille en comparant, chez le même animal, les effets de deux doses identiques de vasotocine administrées, la première seule au début de l'expérience et la seconde après l'injection de peptide inactif en quantité de 10 à 100 fois plus élevée.

Après avoir rappelé le protocole expérimental employé, nous présentons séparément les résultats obtenus avec l'ocytocine d'une part et la lysine-vasopressine, d'autre part, et nous dégageons enfin les conclusions auxquelles ils conduisent.

A. Protocole expérimental.

Nous avons utilisé des grenouilles préparées de la manière habituelle et maintenues dans de l'eau courante à la température du laboratoire jusqu'au jour de l'expérience.

Déroulement d'une expérience.

Au début de l'expérience, de l'inuline a été administrée à chaque animal à raison de 40 mg/100 g de poids corporel et le débit urinaire enregistré de manière continue.

Après une période d'équilibration de 30 mn environ, pendant laquelle la régularité du débit urinaire est contrôlée, une petite dose de vasotocine (arginine- ou lysine-vasotocine) a été administrée soit par injection intravasculaire unique, soit par perfusion continue pendant 20 mn. Dès la fin de l'action de la vasotocine marquée par le retour du débit urinaire à une valeur voisine du débit mesuré avant l'injection — une quantité de 10 à 100 fois supérieure d'ocytocine ou de lysine-vasopressine a été injectée ; puis, après une période de durée suffisante (5 à 10 mn) pour vérifier l'absence d'activité biologique propre de la lysine vasopressine ou de l'ocytocine, une deuxième dose de vasotocine identique à la première a été administrée. Toutefois, dans plusieurs expériences, la vasotocine et le peptide inactif ont été injectés simultanément.

Pendant toute la durée de l'expérience, l'urine émise par les deux reins a été recueillie en échantillons successifs caractéristiques, soit des périodes témoins précédant les injections hormonales, soit de l'action antidiurétique de la vasotocine. Toutes les 30 mn, un volume de 0,2 ml de sang a été prélevé dans l'artère iliaque. La pression osmotique, la concentration de l'inuline et du sodium dans chaque échantillon d'urine et de plasma ont été mesurées en fin d'expérience.

Mode d'expression des résultats.

Pour chacune des deux doses de vasotocine administrées au cours de la même expérience, les intensités des effets de l'hormone sur la filtration glomérulaire et la réabsorption tubulaire d'eau libre et de sodium ont été mesurées par la baisse de la clearance de l'inuline et des clearances relatives de l'eau libre et du sodium rapportée aux valeurs mesurées au cours de la période de collection des urines précédant immédiatement l'injection.

L'intensité de l'inhibition a été mesurée par la différence des intensités respectives des effets des deux doses successives de vasotocine, exprimée en p. 100 de l'intensité des effets de la première injection d'hormone.

Les doses de vasotocine, d'ocytocine ou de lysine-vasopressine ont été exprimées en µg de peptide pur.

B. Résultats.

Cas de l'ocytocine.

La fig. 21 illustre les résultats d'une expérience caractéristique. On observe qu'une faible dose de lysine-vasotocine (0,013 µg) injectée au début de l'expérience produit des effets caractéristiques décrits précédemment : une action antidiurétique marquée, associée à une baisse discrète de la filtration glomérulaire et une stimulation de la réabsorption tubulaire d'eau libre et de sodium (baisse de clearances relatives, C_{H_2O}/C_{in} et C_{Na}/C_{in}). L'ocytocine administrée en quantité 35 fois plus grande (0,455 µg) est dépourvue d'activité biologique propre mais inhibe complètement les effets tubulaires d'une nouvelle dose de 0,013 µg de lysine-vasotocine injectée 15 mn plus tard (pas de variation des clearances relatives C_{H_2O}/C_{in} et C_{Na}/C_{in}). En revanche, les deux doses de vasotocine produisent une baisse de la filtration glomérulaire d'amplitude comparable et l'inhibition par l'ocytocine de l'action antidiurétique globale n'est que partielle.

Les tableaux XIV et XV résument les résultats de 18 expériences analogues au cours desquelles nous avons recherché l'inhibition par l'ocytocine des actions de l'arginine-vasotocine (5 expériences : tableau XIV) ou de la lysine-vasotocine (13 expériences : tableau XV).

L'analyse des données numériques présentées montre que l'arginine- ou la lysine-vasotocine, administrée à l'animal après l'injection d'ocytocine en quantité de 7 à 36 fois supérieure, produit une baisse des clearances relatives de l'eau libre et du sodium toujours inférieure et, dans la plupart des cas, négligeable par rapport

aux actions de la même dose de vasotocine administrée seule au début de l'expérience. Les valeurs moyennes du pourcentage d'inhibition de chacune de ces deux actions tubulaires de 81 ± 17 et 87 ± 14 dans le cas de l'arginine-vasoto-

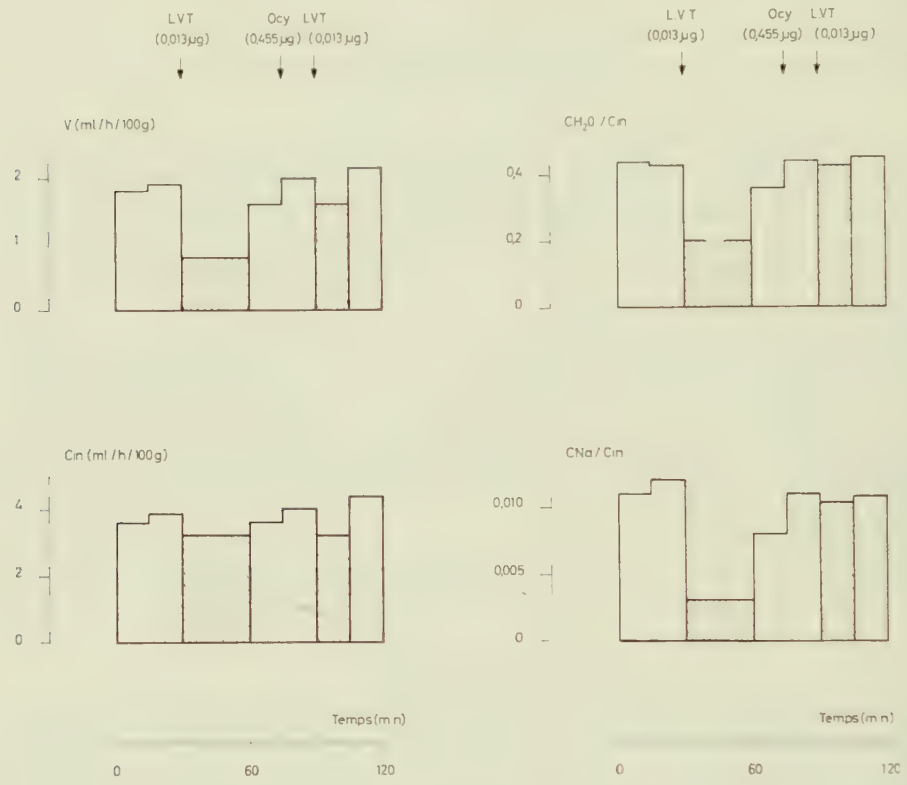


FIG. 21. — Inhibition pour l'ocytocine des actions de la lysine-vasotocine sur le rein de la Grenouille.

Expérience du 4-4-1962. Évolution, en fonction du temps en mn, du débit urinaire (V), de la filtration glomérulaire (C_{in}), et des clearances relatives de l'eau libre (C_{H_2O}/C_{in}) et du sodium (C_{Na}/C_{in}). Les flèches indiquent les injections de lysine-vasotocine (LVT) ou d'ocytocine (Ocy).

Commentaires dans le texte.

cine et de 88 ± 7 et 78 ± 11 dans le cas de la lysine-vasotocine indiquent une inhibition pratiquement complète.

En revanche, l'ocytocine ne modifie pas de manière systématique la baisse de filtration glomérulaire produite par l'injection de vasotocine. Malgré une dispersion marquée des valeurs individuelles, la valeur moyenne du pourcentage d'inhibition de l'effet glomérulaire est voisine de o tant dans le cas de l'arginine (— 5 ± 56) que dans le cas de la lysine vasotocine (— 4 ± 25).

Dans cette série expérimentale, il n'apparaît pas de corrélation entre les pourcentages d'inhibition observés pour chacun des deux effets tubulaires et le rapport des quantités d'ocytocine et de vasotocine administrées au même animal.

TABLEAU XIV. — *Inhibition par l'ocytocine de l'effet glomérulaire et des deux actions tubulaires de l'arginine-vasotocine.*

Exp. n°	Dose A V.T. (µg)	Rapport de dose Ocy / A.V.T.	% baisse C_{in}			% baisse C_{H_2O}/C_{in}			% baisse C_{osm}/C_{in}		
			A.V.T.	A.V.T. + Ocy	% inhibition	A.V.T.	A.V.T. + Ocy	% inhibition	A.V.T.	A.V.T. + Ocy	% inhibition
1	0,012	10	41	19	54	15	5	67	51	1	98
2	0,040	15	5	6	— 25	42	7	83	42	9	79
3	0,012	20	35	37	— 6	32	1	97	57	12	79
4	0,020	24	15	25	— 67	53	18	66	42	9	79
5	0,035	40	16	13	19	57	6	90	40	0	100
Moyennes :					— 5 ± 56			81 ± 17			87 ± 14

Pour chaque expérience numérotée de 1 à 5, sont indiqués :
— la dose d'arginine-vasotocine (A.V.T.) employée en µg ;
— le rapport des quantités d'ocytocine (Ocy) et de vasotocine injectées successivement ;
— les intensités de l'effet glomérulaire et de deux effets tubulaires de la vasotocine, mesurées avant (A.V.T.) ou après l'administration d'ocytocine (A.V.T. + Ocy) ;
— le pourcentage d'inhibition de chacun des effets étudiés.
Les valeurs moyennes indiquées sont accompagnées de leur intervalle de confiance au seuil de probabilité de 0,05.

TABLEAU XV. — *Inhibition par l'ocytocine de l'effet glomérulaire et des deux actions tubulaires de la lysine-vasotocine.*

Exp. n°	Dose L.V.T. (µg)	Rapport de dose Ocy / L.V.T.	% Baisse C_{in}			% baisse C_{H_2O}/C_{in}			% baisse C_{osm}/C_{in}		
			L.V.T.	L.V.T. + Ocy	% inhibition	L.V.T.	L.V.T. + Ocy	% inhibition	L.V.T.	L.V.T. + Ocy	% inhibition
6	0,021	7	54	53	2	28	— 1	104	43	15	65
7	0,010	10	29	12	59	42	0	100	56	6	89
8	0,010	10	38	39	— 3	47	12	75	41	15	63
9	0,138	10	12	21	— 75	23	2	91	40	13	68
10	0,138	10	12	22	— 83	10	2	90	40	6	85
11*	0,0040	10	31	56	31	64	16	75	58	29	50
12*	0,0019	10	68	49	28	52	2	96	84	29	65
13*	0,0040	11	85	47	45	57	11	81	75	28	63
14*	0,0043	14	18	20	— 11	24	6	75	47	7	85
15	0,021	14	44	42	4	30	3	90	67	4	94
16*	0,0013	34	44	53	— 20	48	12	75	71	— 15	121
17**	0,013	35	16	20	— 25	55	2	96	74	8	89
18*	0,0013	36	25	25	0	18	0	100	38	8	79
Moyennes					— 4 ± 25			88 ± 7			78 ± 11

Légende : voir tableau XIV.
* Expériences pour lesquelles la lysine-vasotocine (L.V.T.) et l'ocytocine ont été administrées simultanément par perfusion continue.
** Expérience décrite ci-dessus à titre d'exemple.

Remarquons enfin que l'intensité de l'inhibition est du même ordre de grandeur, que l'ocytocine et la vasotocine soient injectées successivement ou administrées simultanément par perfusion continue (expériences marquées d'un astérisque).

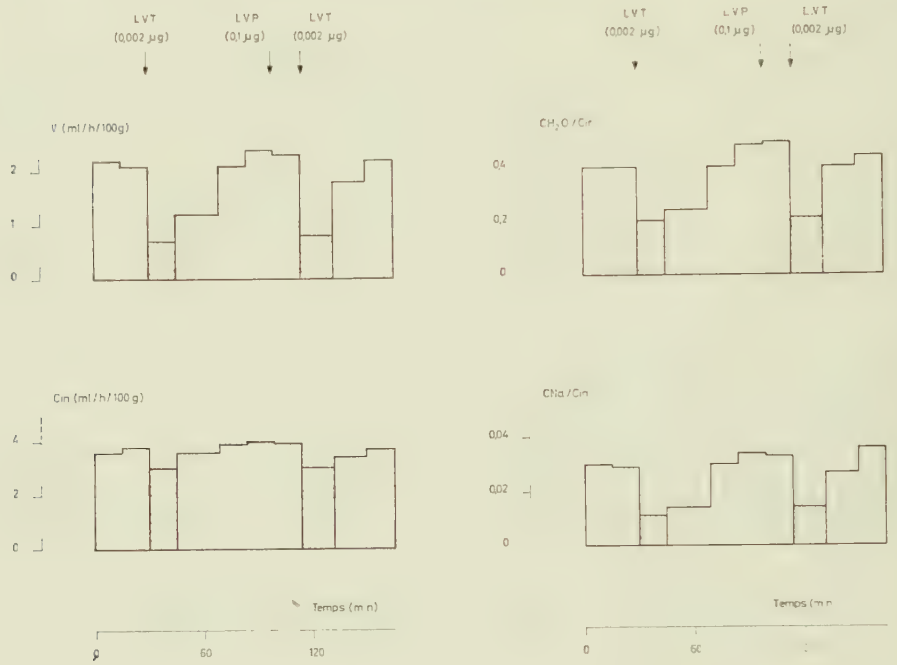


Fig. 22. — Inhibition par la lysine-vasopressine des actions de la lysine-vasotocine sur le rein de la Grenouille.

Expérience du 5-5-1962. Légende : voir fig. 21.

On remarquera que la lysine-vasopressine (L.V.P.) ne modifie pas les réponses du rein à l'injection de la deuxième dose de lysine-vasotocine (L.V.T.)

Cas de la lysine-vasopressine.

Les résultats d'une expérience caractéristique sont illustrés par la fig. 22 qui montre que les deux doses de 0,002 µg de lysine-vasotocine administrées à l'animal produisent des effets d'intensité comparable, qu'il s'agisse de l'action antidiurétique, de la diminution de la filtration glomérulaire ou de la baisse des clearances relatives de l'eau libre et du sodium. La lysine-vasopressine injectée en quantité 50 fois plus grande (0,1 µg) au milieu de l'expérience et qui est dépourvue d'action biologique n'inhibe donc aucune des actions de la lysine-vasotocine sur le rein de la Grenouille.

Les tableaux XVI et XVII résument les résultats de 13 expériences analogues qui ont été réalisées en utilisant soit l'arginine-vasotocine (tableau XVI) soit la lysine-vasotocine (tableau XVII) comme peptide actif.

Bien que les doses de lysine-vasopressine employées dans ces expériences soient de l'ordre de 5 fois supérieures aux doses d'ocytocine produisant une inhi-

TABLEAU XVI. — *Inhibition par la lysine-vasopressine de l'effet glomérulaire et des deux actions tubulaires de l'arginine-vasotocine.*

Exp. n°	Dose A.V.T. (µg)	Rapport de dose L.V.P. / A.V.T.	% baisse C_{in}			% baisse C_{H_2O}/C_{in}			baisse C_{Na}/C_{in}		
			A.V.T.	A.V.T. + L.V.P.	% inhibition	A.V.T.	A.V.T. + L.V.P.	% inhibition	A.V.T.	A.V.T. + L.V.P.	% inhibition
19	0,027	40	10	12	20	36	51	— 42	33	32	3
20	0,027	40	25	25	0	53	34	18	34	34	0
21	0,027	40	15	13	13	32	21	34	38	38	0
22	0,017	54	40	39	3	73	67	8	60	60	0
23	0,015	61	20	21	— 5	43	12	12	37	33	11
Moyennes :					6 ± 12			6 ± 35			3 ± 6

Légende : voir tableau XIV. L.V.P. : Lysine-vasopressine.

TABLEAU XVII. — *Inhibition par la lysine-vasopressine de l'effet glomérulaire et des deux actions tubulaires de la lysine-vasotocine.*

Exp. n°	Dose L.V.T. (µg)	Rapport de dose L.V.P. / L.V.T.	% Baisse C_{in}			% baisse C_{H_2O}/C_{in}			% baisse C_{Na}/C_{in}		
			L.V.T.	L.V.T. + L.V.P.	% inhibition	L.V.T.	L.V.T. + L.V.P.	% inhibition	L.V.T.	L.V.T. + L.V.P.	% inhibition
24*	0,0013	28	35	38	— 9	28	30	— 7	30	38	— 27
25	0,026	35	40	40	0	50	48	4	55	60	— 9
26**	0,002	50	23	25	— 8	50	54	— 8	63	61	5
27	0,012	61	34	35	— 3	47	47	0	51	49	4
28	0,013	70	26	25	4	26	20	23	46	34	26
29*	0,0013	280	12	10	17	28	23	18	34	29	14
30*	0,0013	560	20	19	5	21	17	19	31	32	— 3
31*	0,0013	700	4	4	0	17	18	— 6	20	25	— 25
Moyennes :					1 ± 7			5 ± 10			— 2 ± 15

Légende : voir tableau XIV.

* Expériences pour lesquelles la lysine-vasotocine et la lysine-vasopressine ont été administrées simultanément par perfusion continue.

** Expérience décrite ci-dessus à titre d'exemple.

bition complète, l'analyse de ces tableaux montre que la vasotocine — administrée après l'injection de lysine-vasopressine — produit des effets, tant glomérulaire que tubulaires, d'intensité comparable à celle des effets de la même dose d'hormone administrée seule au début de l'expérience. Les pourcentages d'inhibition calculés pour chaque expérience et pour chacun des trois effets étudiés, sont voisins de 0, même dans les cas où la lysine-vasopressine a été administrée en quantités 280, 560 ou 700 fois supérieures à la dose de vasotocine employée (tableau XVII, expériences n^{os} 29, 30 et 31). Les valeurs moyennes de ce pourcentage d'inhibition qui sont respectivement dans le cas de l'arginine- et de la lysine-vasotocine de 6 $\pm$ 12 et 1 $\pm$ 7 pour l'effet glomérulaire, de 6 $\pm$ 35 et 5 $\pm$ 10 pour l'effet de stimulation de la réabsorption tubulaire d'eau libre et de 3 $\pm$ 6 et — 2 $\pm$ 15 pour l'effet tubulaire de stimulation de la réabsorption du sodium, ne diffèrent pas significativement de 0 au seuil de probabilité de 0,05. Ces résultats indiquent l'absence complète d'interaction entre la lysine-vasopressine et la vasotocine.

C. Interprétation et discussion.

La fig. 23 résume les résultats de l'ensemble des expériences décrites dans ce chapitre. Pour chacun des trois effets étudiés : baisse de la filtration glomérulaire, augmentation de la réabsorption tubulaire d'eau libre et de sodium, nous avons porté l'intensité des actions de la dose de vasotocine injectée après administration d'ocytocine (partie supérieure) ou de lysine-vasopressine (partie inférieure) en fonction de l'intensité des actions de la même dose de vasotocine administrée seule au début de l'expérience. Une distribution des points expérimentaux autour de l'axe des abscisses indique une inhibition complète et une distribution autour de la première bissectrice, une absence d'inhibition.

L'examen de la figure montre que l'ocytocine, bien que dépourvue d'activité biologique propre sur les tubules urinaires de la Grenouille *Rana esculenta*, inhibe pratiquement complètement l'augmentation de la réabsorption tubulaire d'eau libre et de sodium que produisent normalement les vasotocines chez cette espèce, mais ne modifie pas la baisse de filtration glomérulaire qui lui est généralement associée (1). La lysine-vasopressine, également dépourvue d'activité biologique, n'inhibe aucune des trois actions de la vasotocine sur le rein de la Grenouille.

Compte tenu, d'une part des grandes analogies de structure existant entre l'ocytocine et les vasotocines (ces dernières ne différant de l'ocytocine que par la présence en position 8 dans la partie C-terminale de leur molécule d'un acide aminé basique, lysine ou arginine), et, d'autre part, des faibles rapports de masse (de l'ordre de 10) pour lesquels une inhibition complète est observée, nous avons suggéré l'hypothèse de travail suivante (Jard et Morel, 1961 ; Morel et Jard, 1963 *a*, *b*) : l'inhibition des actions tubulaires de la vasotocine résulterait d'une

(1) Cette dernière observation, déjà mentionnée dans la discussion de la deuxième partie de notre exposé, montre que la stimulation par la vasotocine de la réabsorption d'eau libre et de sodium résulte d'une action directe de cette hormone sur les cellules tubulaires et n'est pas la conséquence d'une baisse concomitante de la filtration glomérulaire.

fixation compétitive de l'ocytocine sur le récepteur cellulaire de l'hormone naturelle. La fixation de l'ocytocine ou de la vasotocine sur ce récepteur s'effectuerait par la partie cyclique commune de leur molécule. L'absence, dans la molécule d'ocytocine, d'un acide aminé basique en position 8 rendrait compte de l'absence d'activité biologique de ce peptide sur le rein de la Grenouille. Par contre, la

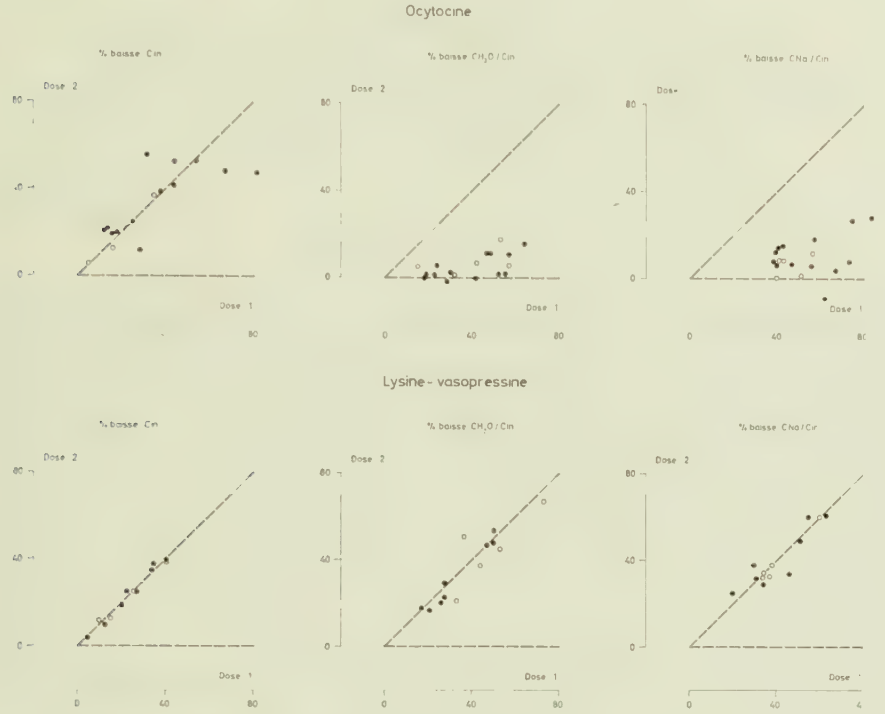


FIG. 23. — Actions glomérulaires et tubulaires de la vasotocine mesurées avant et après l'administration d'ocytocine ou de lysine-vasopressine.
En abscisses : les effets produits par la vasotocine (*cercles évidés* : arginine-vasotocine ; *cercles pleins* : lysine-vasotocine) injectée seule au début de l'expérience.
En ordonnées : les effets d'une dose identique de vasotocine injectée après l'administration d'ocytocine (Ocy) : partie supérieure ou de lysine-vasopressine (L.V.P.) : partie inférieure.
Une distribution des points le long de l'axe des abscisses indique une inhibition complète, et autour de la première bissectrice une absence d'inhibition.

présence de phénylalanine en position 3 dans le cycle de la molécule de vasopressine serait incompatible avec sa fixation sur le récepteur cellulaire de la vasotocine et, de ce fait, la lysine-vasopressine serait dépourvue à la fois de pouvoir inhibiteur et d'activité biologique malgré la présence de lysine en position 8.

Dans la suite de notre travail, nous avons d'une part étudié les principaux caractères des interactions entre l'ocytocine et la vasotocine dans le but d'en définir la nature, compétitive ou non compétitive, et recherché, d'autre part, d'éventuelles corrélations entre les propriétés inhibitrices et la structure moléculaire d'une série de 10 analogues des vasotocines. L'exposé des résultats de cette étude fera l'objet des deux chapitres suivants.

CHAPITRE II

PRINCIPAUX CARACTÈRES DE L'INHIBITION PAR L'OCYTOCINE DES ACTIONS DE LA VASOTOCINE SUR LE REIN DE LA GRENOUILLE

A. Position du problème.

Afin d'en faciliter l'exposé, nous présentons en introduction de ce chapitre un modèle simple des premières étapes du mécanisme d'action des hormones neurohypophysaires, modèle directement inspiré des données classiques de l'enzymologie, développées par Henri (1902) et Michaelis et Menten (1913). Par analogie avec la fixation d'un substrat sur une enzyme, première étape du mécanisme conduisant à la libération finale des produits de la réaction, admettons que les hormones neurohypophysaires se fixent réversiblement sur un récepteur spécifique et qu'à chaque instant l'intensité de la réponse biologique finale est proportionnelle à la concentration du complexe hormone-récepteur ainsi formé. Appelons :

[RT]	: la concentration totale du récepteur
[H]	: la concentration de l'hormone au niveau du récepteur
[R]	: la concentration du récepteur libre
[H-R]	: la concentration du complexe hormone-récepteur
K_1 et K_{-1}	: les constantes de vitesse des réactions de formation et de décomposition du complexe
Kh	: le rapport K_{-1}/K_1 et
Ah	: la constante de proportionnalité liant l'effet biologique final à la concentration du complexe hormone-récepteur.

Dans le cas où l'hormone est administrée seule, la réaction réversible :

$$H + R \underset{K_{-1}}{\overset{K_1}{\rightleftharpoons}} H-R \qquad (1)$$

conduit à un état d'équilibre défini par :

$$K_1 . [H] . [R] = K_{-1} . [H-R] \qquad (2)$$

d'où,

$$[H-R] = \frac{K_1}{K_{-1}} [H] . [R] = \frac{1}{Kh} [H] . [R] \qquad (3)$$

par ailleurs :

$$[R] = [RT] - [H-R] \qquad (4)$$

soit, en combinant (3) et (4) :

$$[H-R] = [RT] \cdot \frac{[H]}{[H] + Kh} \qquad (5)$$

L'effet biologique final, E, est donc égal à :

$$E = Ah\,[RT] \frac{[H]}{[H] + Kh} \qquad (6)$$

La constante Kh a les dimensions d'une concentration. En faisant dans (5) $Kh = [H]$, $[H-R] = \frac{1}{2}[RT]$. Kh est donc égal à la concentration d'hormone libre pour laquelle est obtenue, à l'équilibre, la demi-saturation du récepteur ; c'est une mesure de l' « affinité » de l'hormone pour son récepteur ; l'affinité étant d'autant plus grande que Kh est plus faible.

Pour une concentration donnée d'hormone, l'intensité de l'effet biologique final est fonction non seulement de Kh mais également du coefficient Ah. Ah est une mesure de « l'activité » de l'hormone (Ariens, 1954). Pour un même degré de saturation du récepteur, l'effet biologique final est d'autant plus grand que Ah a une valeur plus élevée.

Pour des valeurs données de Ah, de [RT] et de Kh, la relation (6) implique l'existence d'une relation hyperbolique entre l'intensité de l'effet biologique et la concentration de l'hormone au niveau du récepteur. L'intensité de l'effet biologique E croît avec la concentration [H] de l'hormone et tend pour les valeurs de [H] les plus élevées vers une valeur maximale définie par :

$$E_{Max} = Ah\,[RT] \qquad (7)$$

En utilisant la représentation de Lineweaver et Burk (1934), une relation linéaire lie l'inverse de l'effet biologique à l'inverse de la dose ; en effet de (6) :

$$1/E = \frac{1}{E_{Max}} (1 + Kh/[H]) \qquad (8)$$

Le modèle simple ainsi décrit étant admis, plusieurs mécanismes peuvent rendre compte de l'inhibition des actions de l'hormone naturelle par des analogues de structure voisine.

En premier lieu, l'inhibition observée peut être « réversible » ou « irréversible ». Dans les deux cas, elle implique une interaction entre l'inhibiteur et le récepteur de l'hormone. Dans le cas d'une inhibition réversible un état d'équilibre s'établit entre l'inhibiteur, l'hormone et le récepteur. L'inhibiteur peut déplacer l'hormone fixée sur le récepteur et, réciproquement, l'hormone peut déplacer l'inhibiteur. Dans le cas d'une inhibition irréversible, au contraire, l'inhibiteur se combine irréversiblement avec le récepteur et ne peut être déplacé par l'hormone. L'intensité de l'inhibition augmente progressivement dans le temps, une inhi-

bition complète pouvant être atteinte avec des quantités très faibles d'inhibiteur pour autant qu'elles restent supérieures à la quantité de récepteur présente.

Dans le cas d'une inhibition réversible, l'inhibiteur peut agir soit en modifiant l'« affinité apparente » de l'hormone pour son récepteur, l'inhibition sera alors dite « compétitive », soit en diminuant son « activité », on parlera alors d'inhibition non compétitive.

Cas d'une inhibition compétitive.

Dans ce type d'inhibition, le peptide inhibiteur I peut se fixer réversiblement sur le récepteur de l'hormone naturelle, mais le complexe I-R ne produit pas d'effet biologique (l'activité AI du peptide inhibiteur est nulle). Ce système peut être décrit par les relations suivantes :

$$H + R \rightleftharpoons H-R$$

$$I + R \rightleftharpoons I-R$$

qui conduisent à un état d'équilibre défini par les deux relations :

$$[H-R] = \frac{1}{Kh}\,[H].[R] \qquad (9)$$

et

$$[I-R] = \frac{1}{Ki}\,[I].[R] \qquad (10)$$

dans lesquelles [I] et [I–R] représentent les concentrations respectives du peptide inhibiteur I et du complexe I–R.

Par ailleurs

$$[R] = [RT] - [H-R] - [I-R] \qquad (11)$$

soit en exprimant [I–R] en fonction de [HR] et en remplaçant [R] par sa valeur dans (9)

$$[H-R] = \frac{[H].[RT]}{[H] + Kh\left(1 + \frac{[I]}{Ki}\right)} \qquad (12)$$

L'effet biologique final : E est donc égal à :

$$E = Ah \times [RT]\,\frac{[H]}{[H] + Kh\left(1 + \frac{[I]}{Ki}\right)} \qquad (13)$$

La comparaison de cette relation et de la relation (6) montre que pour une même valeur de [H] l'effet biologique obtenu en présence d'inhibiteur est plus faible que l'effet de l'hormone seule. L'action de l'inhibiteur est équivalente à une diminution apparente de l'affinité de l'hormone pour son récepteur, celle-ci passant de la valeur Kh à la valeur $Kh\left(1 + \frac{[I]}{Ki}\right)$.

L'inhibition finale observée sera d'autant plus marquée que la concentration

[H] de l'hormone sera plus faible, la concentration [I] de l'inhibiteur plus élevée et l'affinité de ce dernier pour le récepteur de l'hormone plus grande. Toutefois, quelle que soit la valeur de $\frac{[I]}{Ki}$ l'effet biologique tendra pour des concentrations très élevées d'hormone vers une valeur maximale E_{Max} $\Delta h = [RT]$ identique à l'effet maximal obtenu avec des doses élevées d'hormone administrée seule.

Le pourcentage d'inhibition (P) tel que nous l'avons calculé dans les expériences décrites au chapitre précédent est égal à $\frac{(6) - (13)}{(6)}$ soit :

$$P = \frac{100}{\frac{[H]}{[I]} \times \frac{Ki}{Kh}\left(1 + \frac{Kh}{[H]}\right) + 1} \qquad (14)$$

d'où

$$1/P = 0{,}01 \left| 1 + \frac{Ki}{Kh}\left(1 + \frac{Kh}{[H]}\right) \frac{1}{[I]/[H]} \right| \qquad (15)$$

Pour une valeur donnée de [H] le pourcentage d'inhibition, P, croît avec le rapport [I]/[H]. Une relation linéaire lie les inverses de ces deux grandeurs.

Cas d'une inhibition non compétitive.

Dans ce type d'inhibition, l'affinité de l'hormone pour son récepteur n'est pas modifiée, seule la constante de proportionnalité liant la concentration du complexe hormone-récepteur à l'intensité de l'effet biologique final est diminuée. Cette action de l'inhibiteur pourrait résulter de sa fixation réversible sur le récepteur en un site différent du site de fixation de l'hormone mais suffisamment proche de lui pour qu'elle entraîne une disparition totale de l'activité du complexe hormone-récepteur formé dans de telles conditions. Dans ce cas, l'intensité de l'inhibition observée ne dépend que de la concentration [I] du peptide inhibiteur. Pour des doses très élevées d'hormone l'intensité de l'effet biologique obtenu tend vers une valeur maximale inférieure à la réponse maximale obtenue par administration d'hormone seule et d'autant plus faible que la concentration du peptide inhibiteur est plus élevée.

Il est donc possible de distinguer ces deux types d'inhibition en comparant les intensités des réponses maximales obtenues avec de fortes doses d'hormone administrées soit seules, soit en présence d'une quantité donnée de peptide inhibiteur, une identité des réponses maximales indiquant la nature compétitive de l'inhibition observée.

Ce modèle simple, qui implique l'existence d'une fixation réversible des hormones neurohypophysaires sur un récepteur cellulaire spécifique, première étape conduisant, par une chaîne de réactions inconnues, à l'effet biologique final, sera discuté en détail dans un chapitre ultérieur ; il a été présenté ici dans le but de définir en termes expérimentalement accessibles, les éléments d'une étude des principaux caractères et du mécanisme de l'inhibition des actions de la vasoto-

cine par l'ocytocine. Dans le cadre de cette analyse, nous nous sommes attachés plus particulièrement à l'étude des principaux points suivants :

1° recherche de la relation liant la concentration de l'hormone au niveau du rein et l'intensité de la réponse biologique finale (le modèle proposé implique l'existence d'une relation hyperbolique entre ces deux grandeurs) ;

2° recherche de la réversibilité de l'inhibition observée ;

3° comparaison des réponses « maximales » de la vasotocine mesurées en l'absence et en présence de l'inhibiteur ;

4° analyse de la relation liant l'intensité de l'inhibition et le rapport des concentrations de l'inhibiteur et de l'hormone administrés simultanément. Les résultats de cette analyse sont présentés ci-dessous dans une série de paragraphes distincts.

B. Relation entre l'intensité des actions tubulaires de la vasotocine et la dose d'hormone administrée.

La relation liant l'intensité des actions tubulaires de la vasotocine et la dose d'hormone administrée a été recherchée en mesurant, chez le même animal, l'intensité des effets de 5 perfusions successives de lysine-vasotocine en quantité progressivement croissante.

Protocole expérimental.

Ces expériences ont été réalisées sur des grenouilles préparées à la manière habituelle et selon le protocole général décrit précédemment. Au cours de la même expérience, 5 doses de vasotocine ont été administrées à l'animal par injection continue dans l'artère iliaque ; la dose d'hormone a été doublée d'une perfusion à la suivante à l'exception de la dernière correspondant à l'administration d'une quantité d'hormone 10 fois supérieure à la dose précédemment injectée.

Pour chaque perfusion, l'intensité des deux effets tubulaires de la vasotocine a été calculée de la manière habituelle en comparant les valeurs de la clearance relative de l'eau libre et de la clearance relative du sodium mesurées respectivement sur deux échantillons d'urine recueillis l'un avant le début de l'injection, l'autre au maximum de l'effet antidiurétique.

Résultats.

Les résultats des deux expériences ainsi réalisées sont présentés dans la figure 24. Pour chacune des deux actions tubulaires, stimulation de la réabsorption d'eau libre et stimulation de la réabsorption de sodium, l'intensité des effets mesurés croît avec la dose d'hormone administrée et tend vers une valeur maximale pour les doses de vasotocine les plus élevées. La relation obtenue est de nature hyperbolique, en effet, comme le montre la partie inférieure de la figure, une relation linéaire lie avec une très bonne approximation l'inverse de l'effet à l'inverse de

la dose, les coefficients de corrélation calculés étant tous compris entre 0,990 et 1,000.

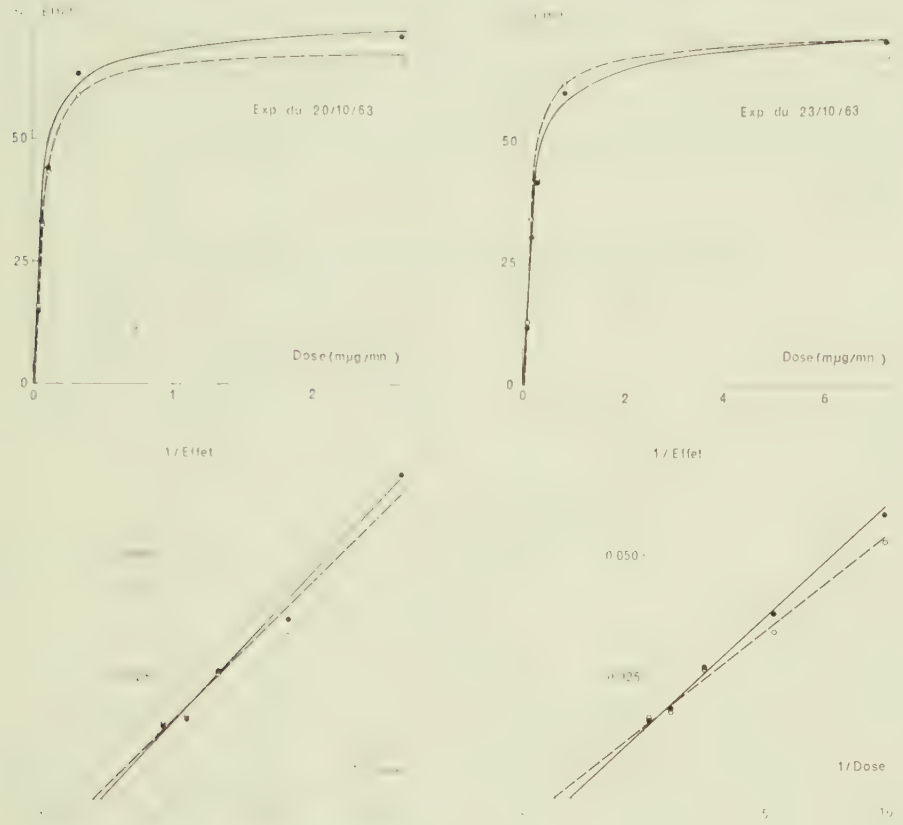


FIG. 24. — Relation entre l'intensité des effets tubulaires de la lysine-vasotocine et la dose d'hormone administrée.

Expériences du 20-10-1962 (partie gauche) et du 23-10-1962 (partie droite).

Partie supérieure : En abscisses : la dose d'hormone administrée ; en ordonnées : l'intensité de chacun des deux effets tubulaires mesurés par la baisse des clearances relatives de l'eau libre (*cercles pleins*) et du sodium (*cercles évidés*) exprimée en p. 100 des valeurs témoins.

On notera la nature hyperbolique des courbes obtenues.

Partie inférieure : en abscisses : l'inverse de la dose ; en ordonnées : l'inverse de l'effet. On observera qu'une relation linéaire lie ces deux grandeurs.

Commentaires dans le texte.

INTERPRÉTATION ET DISCUSSION.

En admettant que la concentration d'hormone libre atteinte à l'équilibre dans le plasma est proportionnelle au débit d'injection, les courbes expérimentales obtenues traduisent l'existence d'une relation hyperbolique entre l'intensité des effets biologiques de la vasotocine et la concentration de l'hormone libre au niveau de son récepteur. Ces résultats sont en accord avec le modèle simple présenté en introduction de ce chapitre, mais ne constituent pas une preuve formelle de

sa validité. Il n'est pas établi, en effet, que le facteur limitant l'intensité de la réponse biologique soit dans tous les cas la concentration du complexe hormone-récepteur, ni qu'une relation de simple proportionnalité lie l'intensité de l'effet à la concentration de ce complexe. Toutefois, le mode de représentation que nous avons adopté nous paraît préférable à celui plus généralement utilisé qui consiste à porter l'intensité de la réponse en fonction du logarithme de la dose d'hormone et dont la justification sur le plan des mécanismes impliqués semble plus difficile à formuler.

TABLEAU XVIII. — *Calcul du coefficient d'affinité de la vasotocine pour son récepteur. Mesure de l'intensité des actions maximales de l'hormone.*

	Stimulation de la réabsorption d'eau libre	Stimulation de la réabsorption de sodium
Expérience du 20-10-63 (*Grenouille* : *poids* : 50 *g*).		
Coefficient d'affinité (Kh) : quantité injectée (mμg/mn)	0,13	0,12
Coefficient d'affinité (Kh) : concentration dans les liquides extracellulaires (M/l)	$0{,}62 \times 10^{-10}$	$0{,}55 \times 10^{-10}$
Action maximale (Ah RT)	82	78
Expérience du 23-10-63 (*Grenouille* : *poids* : 83 *g*).		
Coefficient d'affinité (Kh) : quantité injectée (mμg/mn)	0,32	0,27
Coefficient d'affinité (Kh) : concentration dans les liquides extracellulaires (M/l)	$0{,}92 \times 10^{-10}$	$0{,}76 \times 10^{-10}$
Action maximale (Ah RT)	72	69

Les valeurs de Kh et Ah RT ont été calculées pour chacun des deux effets étudiés à partir de l'équation des droites de régression linéaire de la figure 24. Celles-ci coupent l'axe des abscisses en un point d'abscisse égal à — 1/Kh et l'axe des ordonnées en un point d'ordonnée égale à 1/Ah RT. Les valeurs de AhRT mesurent la baisse maximale théorique des clearances relatives de l'eau libre et du sodium exprimée en p. 100 des valeurs témoins précédant l'injection. Les valeurs de Kh représentent le taux d'injection de vasotocine produisant une réponse d'intensité égale à 50 p. 100 de l'intensité des réponses maximales. Les concentrations correspondantes d'hormone dans le sang (M/l) ont été calculées par : $S = Ix / V \times Dx$ où Ix représente le taux d'injection en M/mn, V le volume de distribution (l) pris égal à 30 p. 100 du poids du corps et Dx le coefficient de destruction pris égal à 0,14 (valeur correspondant à une période biologique de 5 mn).
Commentaires dans le texte.

Dans le but de définir un ordre de grandeur du coefficient d'affinité Kh de la vasotocine pour le récepteur tubulaire du rein de la Grenouille, nous avons calculé la concentration plasmatique correspondant à la dose d'hormone produisant un effet égal à 50 p. 100 de l'effet maximum. Pour ce calcul, nous avons admis :

— que la vitesse de destruction des hormones neurohypophysaires chez la Grenouille est, comme chez les Mammifères (HELLER, 1956), proportionnelle à leur concentration instantanée dans le plasma ;

que le volume de distribution représente 30 p. 100 du poids du corps ;
— que la période biologique de la vasotocine est de 5 mn. Cette dernière valeur a été choisie en fonction des résultats obtenus chez les Mammifères (dans ce

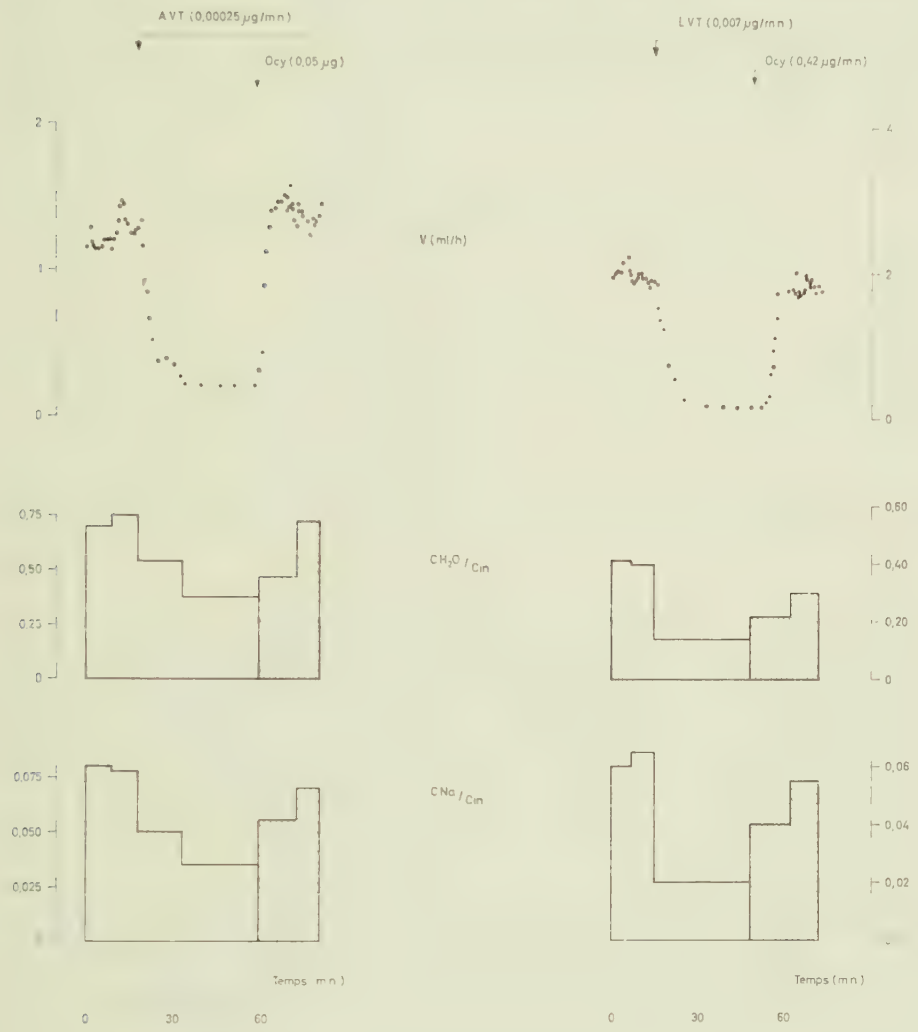


FIG. 25. — Réversibilité de l'inhibition par l'ocytocine des actions de la vasotocine sur le rein de la Grenouille.

Expériences du 3-5-1961 et du 5-5-1961. Évolution en fonction du temps, du débit urinaire (V) et des clearances relatives de l'eau libre (C_{H_2O}/C_{in}) et du sodium (C_{Na}/C_{in}). On observera que l'injection ou la perfusion d'ocytocine (Ocy) au cours d'une perfusion continue d'arginine-vasotocine (A.V.T.) ou de lysine-vasotocine (L.V.T.) interrompt rapidement les effets de l'hormone.

groupe la période biologique de l'ocytocine et de la vasopressine est de l'ordre de 1 mn) et en tenant compte d'une vitesse de destruction vraisemblablement plus lente chez les poïkilothermes que chez les homéothermes.

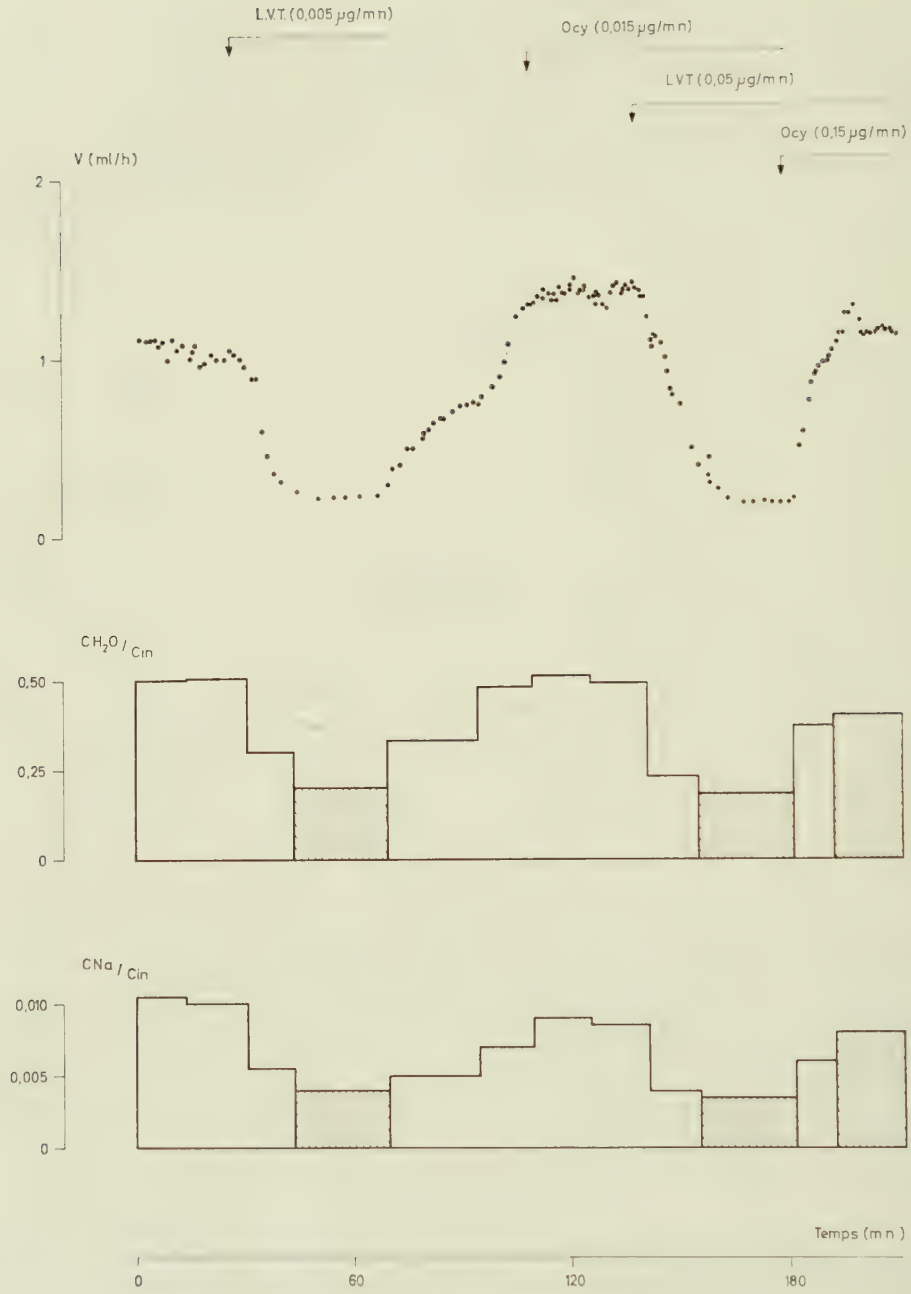


FIG. 26. — Actions de la lysine-vasotocine administrée en présence d'ocytocine. Expérience du 20-5-1961. Légende : voir fig. 25.

On observera que la lysine-vasotocine administrée en dose élevée au cours d'une perfusion d'ocytocine produit un effet antidiurétique et deux effets tubulaires marqués. En fin d'expérience, l'augmentation de la dose d'ocytocine perfusée entraîne une inhibition des effets de l'hormone.

Les valeurs de Kh ainsi calculées de même que les intensités maximales Ah RT correspondant à chacun des deux effets étudiés sont portées sur le tableau XVIII. On remarquera que les valeurs numériques obtenues pour un animal donné sont comparables, que l'on considère l'une ou l'autre des deux actions tubulaires mesurées. Les valeurs de Kh ainsi obtenues sont de l'ordre de 1 000 à 10 000 fois inférieures aux valeurs les plus faibles de la constante de MICHAELIS mesurées dans le cas des réactions enzymatiques. Elles indiquent une très grande affinité de la vasotocine pour son récepteur.

C. Réversibilité de l'inhibition par l'ocytocine des actions tubulaires de la vasotocine.

PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL.

La réversibilité de l'inhibition étudiée a été recherchée soit en injectant de l'ocytocine au cours de l'effet antidiurétique produit par une perfusion continue de vasotocine, soit au contraire en administrant de fortes doses de vasotocine au cours d'une perfusion continue d'ocytocine.

La préparation des animaux, le protocole général de l'expérience et le mode d'expression des résultats sont identiques à ceux décrits précédemment.

RÉSULTATS.

La fig. 25 illustre les résultats de deux expériences caractéristiques. On remarquera que l'administration d'ocytocine à la Grenouille au cours d'une perfusion continue d'arginine- ou de lysine-vasotocine, produit une inhibition marquée des effets de l'hormone.

L'analyse de l'évolution du débit urinaire, enregistré de manière continue au cours de l'expérience, montre que l'inhibition produite par l'ocytocine se développe dans le temps avec une cinétique comparable à la cinétique d'installation de l'effet antidiurétique de l'hormone.

La fig. 26 montre qu'une dose élevée de vasotocine (0,05 µg/mn) administrée au cours d'une perfusion de 0,015 µg/mn d'ocytocine produit un effet antidiurétique et une stimulation de la réabsorption tubulaire d'eau libre et de sodium d'intensité comparable aux effets d'une dose de vasotocine dix fois plus faible (0,005 µg/mn) perfusée seule au début de l'expérience. De plus, la perfusion de vasotocine étant maintenue, une nouvelle perfusion d'ocytocine en quantité trois fois plus élevée (0,15 µg/mn) produit une inhibition marquée des trois effets étudiés.

De plus, comme l'indique la figure 27, l'inhibition produite par l'injection rapide d'une forte dose d'ocytocine à l'animal disparaît progressivement dans le temps. Mesurée 15 mn après l'injection d'inhibiteur, l'inhibition est complète ; une heure après, elle n'est que partielle et a pratiquement disparu au bout de deux heures. Ces résultats traduisent vraisemblablement une destruction rapide de l'ocytocine injectée.

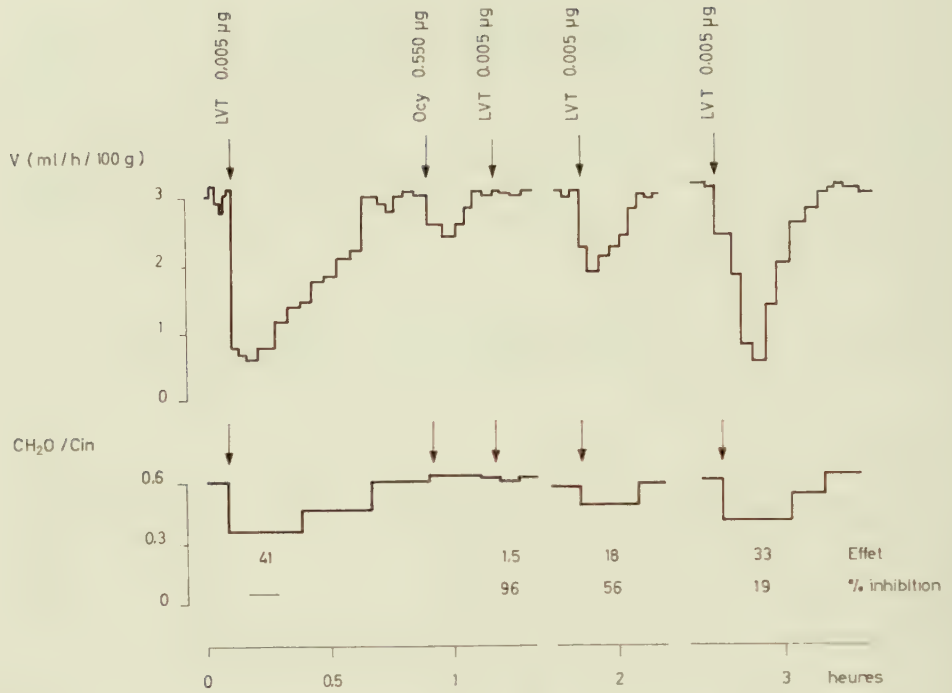


FIG. 27. — Disparition progressive dans le temps de l'inhibition des actions de la lysine-vasotocine produite par l'injection d'une forte dose d'ocytocine. Évolution en fonction du temps en heures du débit urinaire (V) et de la clearance relative de l'eau libre (C_{H_2O}/C_{in}). Les flèches marquent l'injection de 4 doses successives identiques de lysine-vasotocine (L.V.T.) la première au début de l'expérience et les trois dernières 15 mn, 1 h et 2 h avec l'injection de 0,55 µg d'ocytocine (Ocy). On remarquera la disparition progressive de l'inhibition produite par l'ocytocine.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

Les observations décrites dans ce paragraphe et reproduites un grand nombre de fois au cours de ce travail (voir par exemple les expériences citées au paragraphe suivant) suggèrent que l'ocytocine, injectée au cours de l'action de la vasotocine, déplace l'hormone fixée par son récepteur. Inversement, à la condition d'être administrée en quantité suffisante, l'hormone produit des effets marqués en présence de l'inhibiteur. Ces résultats montrent que l'inhibition étudiée est de nature réversible.

D. Comparaison des actions maximales de la vasotocine mesurées en présence ou en l'absence d'ocytocine.

PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL.

Cette étude a été effectuée sur cinq animaux préparés de la manière habituelle. Au début de l'expérience, une dose importante de vasotocine (de 0,01 à 0,1 µg/mn) a été administrée par perfusion continue, puis le maximum de l'action antidiuré-

TABLEAU XIX. — *Comparaison des actions tubulaires maximales de la lysine-vasotocine mesurées en l'absence ou en présence d'ocytocine.*

Date	Lysine-vasotocine			Lysine-vasotocine en présence d'ocytocine				Lysine-vasotocine en excès en présence d'ocytocine			
		(1)	(2)			(3)	(4)			(5)	(6)
	Dose L. V. T. (µg mn)	% baisse C_{H_2O}/C_{in}	% baisse C_{Na}/C_{in}	Dose L. V. T. (µg mn)	Dose Ocy (µg mn)	% baisse C_{H_2O}/C_{in}	% baisse C_{Na}/C_{in}	Dose L. V. T. (µg mn)	Dose Ocy (µg mn)	% baisse C_{H_2O}/C_{in}	% baisse C_{Na}/C_{in}
7-5-62	0,01	65	71	0,01	0,03	26	18	0,10	0,03	63	67
17-5-62	0,06	70	72	0,06	0,15	33	33	0,60	0,15	73	75
8-6-63	0,005	61	63	—	—	—	—	0,05	0,015	65	65
9-6-63	0,01	74	65	0,01	0,05	20	15	0,20	0,05	70	63
10-6-63	0,05	68	60	0,05	0,15	40	35	0,50	0,15	70	65
Moyennes		$67,6 \pm 6,1$	$66,2 \pm 6,4$			$29,8 \pm 13,5$	$25,3 \pm 16,2$			$68,2 \pm 5,1$	$67,0 \pm 0,58$

Différences : (1) — (5) :	$-0,6 \pm 4,3$	$t = 0,391$	$P > 0,7$	N.S
(2) — (6) :	$-0,8 \pm 4,6$	$t = 0,483$	$P > 0,6$	N.S
(1) — (3) :	$39,5 \pm 17,1$	$t = 7,335$	$P < 0,005$	
(2) — (4) :	$34,3 \pm 20,1$	$t = 5,427$	$P < 0,005$	

Pour chacune des trois perfusions d'hormone réalisées au cours de la même expérience, le tableau indique : les doses de lysine-vasotocine (L.V.T. et d'ocytocine (Ocy), employées en µg mn, et les intensités de chacun des deux effets tubulaires étudiés : baisse de la clearance relative de l'eau libre (C_{H_2O}/C_{in}) et du sodium (C_{Na}/C_{in}).

Les valeurs moyennes indiquées sont accompagnées de leur intervalle de confiance au seuil de probabilité de 0,05. L'intensité des actions des deux perfusions d'ocytocine et de vasotocine ont été comparées aux actions de la vasotocine administrée seule en calculant, pour chaque expérience, la différence entre les valeurs des colonnes (1) et (5), (2) et (6) d'une part, et des colonnes (1) et (3), (2) et (4) d'autre part et en comparant les moyennes obtenues à 0. Les valeurs correspondantes de t et de P sont indiquées au bas du tableau. Les valeurs de P < 0,005 indiquent une différence très significative et les valeurs de P > 0,6 une absence de différence.

tique étant atteint, une seconde perfusion d'un mélange de vasotocine à la même concentration et d'ocytocine en quantité de 2 à 5 fois supérieure a été commencée et poursuivie jusqu'à ce que le débit urinaire atteigne sa nouvelle valeur d'équi-

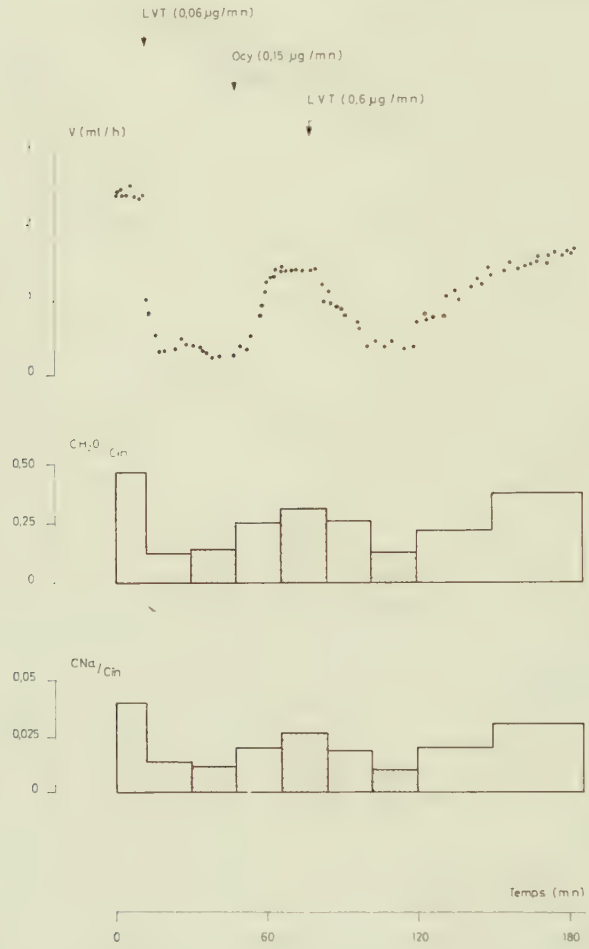


FIG. 28. — Comparaison des actions maximales de la lysine-vasotocine mesurées en présence et en l'absence d'ocytocine.

Expériences du 17-5-1961. Évolution en fonction du temps du débit urinaire (V) et des clearances relatives de l'eau libre (C_{H_2O}/C_{in}) et du sodium (C_{Na}/C_{in}).

On remarquera que la dose de vasotocine (L.V.T.) employée produit une diminution marquée de ces trois grandeurs, la perfusion d'ocytocine (Ocy) entraine une inhibition partielle des effets observés, celle-ci étant maintenue, la perfusion d'une dose de vasotocine 10 fois plus élevée restaure la réponse initiale. Les zones hachurées correspondent aux périodes choisies pour le calcul de l'intensité des actions tubulaires (voir tableau XIX).

libre. Enfin, la quantité d'ocytocine étant maintenue constante, la concentration de vasotocine dans le mélange a été augmentée 10 fois. Au cours de l'expérience, le débit urinaire est enregistré de manière continue, l'urine émise par les deux reins étant recueillie par échantillons successifs caractéristiques de chacune des

phases de l'expérience. L'intensité des actions tubulaires des trois perfusions d'hormone réalisées a été mesurée de la manière habituelle.

Résultats.

La fig. 28 illustre les résultats d'une expérience caractéristique. L'analyse des tracés obtenus montre qu'aux doses utilisées, la lysine-vasotocine produit une baisse très marquée du débit urinaire et des clearances relatives de l'eau libre et du sodium. En présence de la même dose de vasotocine, la perfusion continue d'ocytocine produit une inhibition partielle des effets de l'hormone. La perfusion d'ocytocine étant maintenue au même taux, l'administration d'une quantité de vasotocine dix fois plus élevée produit une nouvelle diminution du débit urinaire et des clearances relatives C_{H_2O}/C_{in} et C_{Na}/C_{in}. Les valeurs d'équilibre atteintes sont comparables à celles obtenues par la perfusion de vasotocine seule.

Le tableau XIX résume l'ensemble des résultats obtenus. L'analyse statistique qui l'accompagne montre que l'intensité des deux effets tubulaires produits par l'administration d'un excès de vasotocine au cours d'une perfusion continue d'ocytocine ne diffère pas significativement de l'intensité des réponses maximales de l'hormone injectée seule, bien que les doses d'ocytocine employées produisent une inhibition très significative des actions de la première dose d'hormone.

Résumé et conclusions.

Les résultats présentés dans ce paragraphe montrent que l'intensité des réponses biologiques maximales obtenues avec de fortes doses de lysine-vasotocine est la même, que cette dernière soit administrée seule ou en présence d'ocytocine. Par analogie avec les critères généralement utilisés en enzymologie, ces observations suggèrent que l'inhibition observée est de nature compétitive. Dans cette hypothèse, l'ocytocine, bien que dépourvue d'activité biologique propre sur le tubule urinaire chez la Grenouille, *Rana esculenta*, présenterait donc une affinité élevée pour le récepteur tubulaire de l'hormone naturelle.

E. Relation entre l'intensité de l'inhibition et le rapport des masses d'ocytocine et de lysine-vasotocine administrées simultanément.

Protocole expérimental.

Nous avons recherché la relation liant l'intensité de l'inhibition et le rapport des masses d'ocytocine et de lysine-vasotocine administrées simultanément, en comparant les effets antidiurétique et tubulaires de quatre perfusions successives d'un mélange de lysine-vasotocine en dose constante et d'ocytocine en dose croissante aux effets d'une dose identique de vasotocine administrée seule au début de l'expérience.

Les expériences ont été réalisées sur une série de 6 animaux préparés de la

manière habituelle et avec un protocole général identique à celui des expériences déjà décrites. La lysine-vasotocine et l'ocytocine ont été administrées par perfusion continue dans l'artère iliaque. Dans tous les cas, nous avons choisi une

FIG. 29. — Relation entre le pourcentage d'inhibition des actions tubulaires de la lysine-vasotocine et le rapport des quantités d'ocytocine et de vasotocine perfusées simultanément. Résultats de 6 expériences numérotées de A à F.

Sur la partie gauche des deux moitiés de la figure, en abscisses : le rapport (R) des masses d'ocytocine et de lysine-vasotocine perfusées simultanément, en ordonnées : le pourcentage (P) d'inhibition de chacun des deux effets tubulaires de la vasotocine (baisse de la clearance relative de l'eau libre (*cercles pleins*) et du sodium (*cercles évidés*). On notera la nature hyperbolique des courbes obtenues.

Sur la partie droite : double représentation en inverse (1 /P en fonction de 1 /R).

dose de vasotocine produisant des effets d'intensité moyenne, voisine de 50 p. 100 de l'intensité des réponses maximales généralement observées ; celle-ci a été déterminée approximativement au début de l'expérience en mesurant l'effet antidiurétique produit par l'injection de deux ou de trois doses différentes d'hormone. L'ocytocine a été administrée en quantité respectivement égale, 2,5 5 et 10 fois supérieure à la dose de vasotocine utilisée.

Les actions tubulaires de chacune des 5 perfusions de vasotocine, étudiées chez le même animal au cours de l'expérience, ont été mesurées par la baisse des clearances relatives de l'eau libre et du sodium rapportée aux valeurs mesurées au

cours de la période de collection des urines précédant le début de chaque perfusion. Pour chacune des quatre dernières perfusions, le pourcentage d'inhibition par l'ocytocine des actions tubulaires de la vasotocine a été mesuré de la manière habituelle par référence aux effets de la dose de vasotocine perfusée seule au début de l'expérience.

Résultats.

Le tableau XX présente les résultats d'une expérience caractéristique ; pour chaque perfusion, nous avons indiqué : les valeurs des clearances relatives de l'eau libre et du sodium, mesurées respectivement avant le début de la perfusion et au maximum de l'effet antidiurétique observé, l'intensité de chacun des deux effets tubulaires et les pourcentages d'inhibition correspondants.

L'analyse des données présentées montre que l'inhibition produite par de faibles doses d'ocytocine n'est que partielle et que le pourcentage d'inhibition mesuré est croissant avec le rapport des masses d'ocytocine et de vasotocine perfusées simultanément. De plus, les valeurs individuelles obtenues pour chacun des deux effets tubulaires étudiés sont comparables.

La fig. 29 résume l'ensemble des résultats obtenus ; pour chaque expérience, et pour chacun des deux effets tubulaires, nous avons porté le pourcentage d'inhibition mesuré en fonction du rapport des quantités d'ocytocine et de lysine-vasotocine administrées simultanément. On remarquera que les courbes obtenues sont de nature hyperbolique ; en effet, dans tous les cas, une double représentation en inverse fait apparaître une relation linéaire étroite.

Résumé et conclusion.

La mesure de l'intensité de l'inhibition des actions biologiques d'une faible dose de vasotocine par des quantités croissantes d'ocytocine montre qu'une relation de nature hyperbolique lie le pourcentage d'inhibition mesuré et le rapport des quantités respectives de l'inhibiteur et de l'hormone active administrées simultanément par perfusion continue. Cette observation expérimentale est en accord avec la relation théorique définie dans le cas d'une inhibition compétitive (§ A, relation 14, p. 81). Les valeurs des pentes des droites expérimentales obtenues en utilisant une double représentation en inverses permettent de calculer un ordre de grandeur du rapport des affinités respectives de l'ocytocine et de la lysine-vasotocine pour le récepteur tubulaire de l'hormone naturelle. La pente de la droite théorique définie par : $b = 0{,}01\ Ki/Kh\ (1 + Kh/[H]$, (§ A, relation 15, p. 81), n'est en effet fonction que du rapport Ki/Kh des affinités respectives de l'inhibiteur et du produit actif, et de Kh/[H]. Dans nos conditions expérimentales, la dose de vasotocine employée ayant été choisie telle qu'elle produise des effets d'intensité moitié de l'intensité des effets maximaux, le rapport Kh/[H] peut être, en première approximation, pris égal à l'unité ; Ki/Kh est alors donné par $b/0{,}02$. Le tableau XXI donne l'ensemble des valeurs numériques de Ki/Kh cal-

TABLEAU XX. *Relation entre l'intensité de l'inhibition par l'ocytocine des actions de la vasotocine sur le rein de la Grenouille et le rapport des quantités d'inhibiteur et d'hormone perfusées simultanément.*

Perf. n°	Dose L. V. T. (µg/mn)	Dose Ocy (µg/mn)	Rapport Ocy / L. V. T.	Réabsorption tubulaire d'eau libre				Réabsorption tubulaire de sodium			
				C_{H_2O}/C_{in} témoin	C_{H_2O}/C_{in} Action	% baisse C_{H_2O}/C_{in}	% inhibition	C_{Na}/C_{in} témoin	C_{Na}/C_{in} Action	% baisse C_{Na}/C_{in}	% inhibition
1	0,003	—	—	0,58	0,35	40	—	0,055	0,028	50	—
2	0,003	0,003	1	0,53	0,39	27	33	0,058	0,039	33	24
3	0,003	0,0075	2,5	0,49	0,40	19	53	0,068	0,050	27	46
4	0,003	0,015	5	0,54	0,46	14	65	0,070	0,055	22	56
5	0,003	0,030	10	0,55	0,49	10	75	0,070	0,057	19	62

Pour chacune des 5 perfusions successives (1 à 5), le tableau indique :

— les doses de lysine-vasotocine (L.V.T.) et d'ocytocine (Ocy) administrées simultanément ainsi que leur rapport ;

— la clearance relative de l'eau libre (C_{H_2O}/C_{in}) mesurée avant la perfusion (C_{H_2O}/C_{in} témoin) et au maximum de l'effet antidiurétique (C_{H_2O}/C_{in}-action), la baisse observée exprimée en p. 100 de la valeur témoin et enfin le pourcentage d'inhibition calculé par référence à l'effet de la dose de vasotocine administrée seule ;

— les valeurs correspondantes de la clearance relative du sodium (C_{Na}/C_{in}).

culées pour chacun des effets étudiés, à partir des données de la figure 29. Les valeurs moyennes, voisines de l'unité dans les deux cas, indiquent que les affinités respectives de l'ocytocine et de la lysine-vasotocine pour le récepteur tubulaire du rein de la Grenouille sont du même ordre de grandeur.

TABLEAU XXI. — *Comparaison des affinités de l'ocytocine et de la lysine-vasotocine pour le récepteur tubulaire du rein de la Grenouille.*

Exp.	Ki/Kh (Stimulation de la réabsorption tubulaire d'eau libre)	Ki/Kh (Stimulation de la réabsorption tubulaire de sodium)
A	1,00	0,80
B	0,30	0,70
C	0,70	0,70
D	1,00	2,54
E	1,00	0,65
F	1,15	1,50
Moyennes	0,86 ± 0,33	1,15 ± 0,77

Les valeurs indiquées sont les rapports des coefficients d'affinité Ki et Kh de l'ocytocine et de la lysine-vasotocine. Les lettres A à F se réfèrent aux tracés correspondants de la fig. 29.

Les valeurs moyennes indiquées au bas de chaque colonne sont accompagnées de leur intervalle de confiance au seuil de probabilité de 0,05.

F. Conclusions.

L'application des concepts classiques de l'enzymologie à l'étude de l'inhibition par l'ocytocine des actions de la vasotocine sur le rein de la Grenouille montre que ce peptide se comporte comme un inhibiteur de type purement compétitif de l'hormone naturelle. Ces résultats conduisent à la notion d'une relative indépendance des caractères structuraux de la molécule d'hormone responsables de son affinité pour le récepteur d'une part, et de son activité biologique d'autre part.

Avant de présenter une discussion critique de l'ensemble des faits expérimentaux sur lesquels reposent cette interprétation, nous analysons dans le chapitre suivant les corrélations qui ont pu être mises en évidence entre la structure primaire et les propriétés inhibitrices d'une série d'analogues de la vasotocine.

CHAPITRE III

ÉTUDE DES CORRÉLATIONS ENTRE LA STRUCTURE ET L'AFFINITÉ DE DIX ANALOGUES DE LA VASOTOCINE POUR LE RÉCEPTEUR TUBULAIRE DU REIN DE LA GRENOUILLE

A. Choix des analogues.

La molécule d'ocytocine, inhibiteur compétitif des actions tubulaires de la vasotocine, présente une partie cyclique identique à celle de la molécule de vasotocine, ces peptides ne diffèrent que par la nature de l'acide aminé occupant la position 8 dans la chaîne latérale. La molécule de lysine-vasopressine dont le cycle est différent de celui de la molécule de vasotocine présente une affinité très faible ou nulle pour le récepteur de cette hormone. Ces premières observations nous ont conduit à suggérer que l'affinité de la vasotocine pour son récepteur est dépendante de la structure du cycle de sa molécule et son activité, de la structure de la chaîne latérale. Dans le but de vérifier cette hypothèse, nous avons recherché les propriétés inhibitrices éventuelles de :

1° L'Ileu^{8}-ocytocine, la dé-Leu^{8}-ocytocine, la dé-Pro^{7}-ocytocine qui possèdent dans leur molécule un cycle identique à celui de la molécule de vasotocine, mais une chaîne latérale différente soit par la nature de l'acide aminé occupant la position 8 soit par suppression d'un acide aminé.

2° La déamino-ocytocine, la Val^{3}-ocytocine, la Leu^{3}-ocytocine, la Glu(NH_2)^{5}-ocytocine, dont le cycle ne diffère de celui des vasotocines que par des modifications mineures (suppression du groupe NH_2 terminal en position 1, suppression ou déplacement d'un groupement méthyle dans les chaînes aliphatiques des acides aminés en position 3 ou 5) et dont la chaîne latérale ne comporte pas d'acide aminé basique.

3° La Phe^{3}-ocytocine, la Ser^{4}-Ileu^{8}-ocytocine, la Phe^{2}-Phe^{3}-Lys^{8}-ocytocine, analogues dont le cycle diffère de manière importante de celui des vasotocines, par la présence de phénylalanine en position 3 ou de sérine en position 4, et dont la chaîne latérale est identique (Phe^{2} ^{3}-Lys^{8}-ocytocine) ou différente de la chaîne latérale de la vasotocine (Phe^{3}-ocytocine, Ser^{4}-Ileu^{8}-ocytocine).

Pour plusieurs de ces analogues nous avons recherché d'éventuelles propriétés inhibitrices, à la fois vis-à-vis de la lysine- et de l'arginine-vasotocine. Aucune

différence n'apparaissant dans les résultats obtenus, que l'on utilise l'un ou l'autre de ces peptides comme produit actif, nous avons limité la suite de notre étude à la recherche des interactions avec la seule lysine-vasotocine ; le tableau XXII donne la liste des différentes interactions recherchées.

TABLEAU XXII. — *Liste des interactions étudiées entre les vasotocines et* 10 *de leurs analogues de structure.*

Analogue inactif	Peptide actif	
	Arg^8-ocytocine	Lys^8-ocytocine
Ileu^8-ocytocine	—	—
dé-Leu^8-ocytocine		+
dé-Pro^7-ocytocine		+
Déamino-ocytocine	+	+
Leu^3-ocytocine		
Val^3-ocytocine	+	+
Glu(NH$_2$)^5-ocytocine		+
Phe^3-ocytocine		+
Phe$^{2\ 3}$-Lys^8-ocytocine	+	+
Ser^4-Ileu^8-ocytocine		+

Les peptides sont désignés selon la terminologie classique par référence à la molécule d'ocytocine, l'arginine-vasotocine correspondant à l'Arg^8-ocytocine et la lysine-vasotocine à la Lys^8-ocytocine. Les interactions étudiées sont marquées du signe +.

Dans la deuxième partie de notre exposé nous avons montré qu'aucun des analogues considérés, même administrés à forte dose, ne produit les effets tubulaires caractéristiques de l'injection de vasotocine. Toutefois, ils produisent, pour la plupart un effet natriurique marqué. Ce dernier pouvant masquer l'action de la vasotocine injectée simultanément sur la réabsorption tubulaire de sodium, nous avons limité notre étude à la recherche de l'inhibition par ces peptides du seul effet de stimulation de la réabsorption tubulaire d'eau libre.

B. Protocole expérimental.

L'intensité de l'inhibition de l'action de la vasotocine sur la réabsorption tubulaire d'eau libre par chacun des dix peptides étudiés a été déduite de la comparaison des effets de deux doses identiques d'hormone administrées au même animal, l'une avant et l'autre après l'injection de peptide inactif.

Le protocole expérimental employé est identique à celui que nous avons utilisé pour mettre en évidence les propriétés inhibitrices de l'ocytocine et qui est

décrit au chapitre premier. Les effets de doses maximales d'hormone pouvant être identiques en présence ou en l'absence d'un inhibiteur compétitif, nous avons, dans tous les cas, utilisé des doses de vasotocine produisant des effets d'intensité moyenne ou faible.

C. Résultats.

Les résultats de l'ensemble de nos expériences sont présentés dans les tableaux XXIII, XXIV, XXV, qui indiquent pour chacune d'entre elles : la dose de vasotocine employée, le rapport des masses respectives d'analogue inactif et de vasotocine administrées simultanément au cours de la dernière partie de l'expérience, la baisse de la clearance relative de l'eau libre produite par chacune des deux doses identiques d'hormone injectées au même animal, et, enfin, le pourcentage d'inhibition correspondant.

Le tableau XXIII présente les résultats obtenus avec l'Ileu^{8}-ocytocine, la dé-Leu^{8}-ocytocine et la dé-Pro^{7}-ocytocine analogues dont la molécule présente une partie cyclique identique à celle de la molécule de vasotocine.

L'analyse de ce tableau montre que l'Ileu^{8}-ocytocine et la dé-Leu^{8}-ocytocine inhibent, de manière presque complète, la stimulation de la réabsorption d'eau libre produite par l'injection de faibles doses de vasotocine (arginine- et lysine-vasotocine dans le cas de l'Ileu^{8}-ocytocine et lysine-vasotocine seule dans le cas de la dé-Leu^{8}-ocytocine). En effet, la vasotocine administrée à l'animal après l'injection de ces peptides produit une baisse de la clearance relative de l'eau libre toujours inférieure et, dans la plupart des cas, négligeable par rapport à l'action de la même dose d'hormone injectée seule au début de l'expérience.

Comme dans le cas de l'ocytocine une inhibition pratiquement complète est observée avec des doses de peptides seulement 10 fois plus élevées que les doses d'hormone employées. Ces observations montrent que l'Ileu^{8}-ocytocine et la dé-Leu^{8}-ocytocine ont une affinité élevée pour le récepteur tubulaire de la vasotocine.

En revanche, la dé-Pro^{7}-ocytocine même administrée en doses élevées (100 fois plus grandes que la dose d'hormone) ne modifie pas de manière significative les réponses du rein de la Grenouille à de petites doses de vasotocine.

Le tableau XXIV présente les résultats obtenus avec la déamino-ocytocine, la Val^{3}-ocytocine, la Leu^{3}-ocytocine et la Glu(NH$_2$)^{5}-ocytocine analogues dont le cycle de la molécule ne diffère de celui de la molécule de vasotocine que par des modifications mineures. L'analyse des données expérimentales montre que ces peptides inhibent de manière pratiquement complète l'action de la vasotocine sur la réabsorption tubulaire d'eau libre. La suppression du groupement aminé terminal en position 1, le déplacement ou la suppression d'un groupement méthyle dans les chaînes aliphatiques des acides aminés occupant les positions 3 ou 5 sont donc compatibles avec le maintien d'une affinité élevée pour le récepteur tubulaire de la vasotocine ; l'absence d'activité biologique de ces peptides sur le rein de la Grenouille résultant vraisemblablement de l'absence d'un acide aminé basique en position 8 dans la chaîne latérale.

TABLEAU XXIII. — *Inhibition par l'Ileu*^{8}*-ocytocine, la dé-Leu*^{8}*-ocytocine et la dé-Pro*^{7}*-ocytocine de l'action de la vasotocine sur la réabsorption d'eau libre par le rein de la Grenouille.*

Exp. n°	Vasotocine : dose (µg)	Rapport de doses : inhibiteur / hormone	% baisse C_{H_2O}/C_{in} : vasotocine seule	% baisse C_{H_2O}/C_{in} : vasotocine + inhibiteur	% inhibition
Analogue inactif : *Ileu*^{8}*-ocytocine*					
Peptide actif : *Arg*^{8}*-ocytocine*					
1	0,016	11	32	8	75
2	0,064	11	36	6	83
3	0,064	11	31	5	84
4	0,032	22	46	7	85
5	0,016	43	14	1	93
Moyennes :			32 ± 14	5 ± 3	84 ± 7
Peptide actif : *Lys*^{8}*-ocytocine*					
6	0,071	10	44	12	73
7	0,027	25	37	13	65
8	0,024	29	47	13	72
9	0,022	31	66	8	88
10	0,021	33	53	2	96
11	0,013	45	23	1	96
12	0,027	51	14	1	93
13	0,013	53	31	5	84
14	0,032	108	49	0	100
15	0,006	115	51	27	47
Moyennes :			41 ± 11	8 ± 6	81 ± 14
Analogue inactif : *dé-Leu*^{8}*-ocytocine* (1).					
Peptide actif : *Lys*^{8}*-ocytocine*					
16	0,0032	10	35	7	80
17	0,0032	10	48	2	94
18	0,0032	10	29	17	42
19	0,0032	25	33	3	91
20	0,0032	100	48	0	100
21	0,0032	100	35	— 7	113
Moyennes :			38 ± 8	4 ± 9	87 ± 24
Analogue inactif : *dé-Pro*^{7}*-ocytocine* (1)					
Peptide actif : *Lys*^{8}*-ocytocine*					
22	0,00064	100	83	82	1
23	0,00125	100	56	65	— 16
24	0,0032	100	44	47	— 7
25	0,0032	100	48	33	31
Moyennes :			58 ± 27	57 ± 43	2 ± 54

Commentaires et explications dans le texte.

Les valeurs moyennes indiquées sont accompagnées de leur intervalle de confiance au seuil de probabilité de 0,05.

(1) Dans ce groupe d'expériences, la vasotocine et l'inhibiteur ont été administrés simultanément par injection continue.

La présence de phénylalanine en position 3 (Phe^3-ocytocine et Phe^2-Phe^3-Lys^8-ocytocine) ou de sérine en position 4 (Ser^4-Ileu^8-ocytocine) entraine, au contraire, une perte très marquée de l'affinité de ces peptides pour le récepteur tubulaire des vasotocines. En effet, comme le montre le tableau XXV aucun de ces analogues ne modifie de manière significative la baisse de la clearance de l'eau libre produite par l'injection de petites doses d'hormone, même lorsqu'ils sont administrés à l'animal en dose importante (1).

TABLEAU XXIV. — *Inhibition par la déamino-ocytocine, la Leu^3-ocytocine, la Val^3-ocytocine et la Glu (NH_2)^5-ocytocine de l'action de la vasotocine sur la réabsorption d'eau libre par le rein de la Grenouille.*

Exp. n°	Vasotocine dose (µg)	Rapport de doses : inhibiteur / hormone	% baisse C_{H_2O}/C_{in} : vasotocine seule	% baisse C_{H_2O}/C_{in} : vasotocine + inhibiteur	% inhibition
Analogue inactif : *déamino-ocytocine*					
Peptide actif : *Arg^8-ocytocine*					
26	0,014	13	44	1	98
27	0,014	16	33	1	97
28	0,014	16	52	5	90
29	0,014	16	41	4	90
30	0,020	16	45	13	71
Moyennes :			43 ± 8	5 ± 6	89 ± 12
Peptide actif : *Lys^8-ocytocine*					
31	0,011	12	26	13	50
32	0,011	25	42	9	79
33	0,011	25	44	12	73
34	0,021	26	43	5	88
35	0,004	68	33	— 1	103
Moyennes :			38 ± 10	8 ± 7	79 ± 24
Analogue inactif : *Leu^3-ocytocine* (1)					
Peptide actif : *Lys^8-ocytocine*					
36	0,0032	85	21	1	92
37	0,0032	85	42	12	58
38	0,0032	85	30	0	100
39	0,0032	85	31	4	87
40	0,0032	85	64	3	92
Moyennes :			38 ± 20	4 ± 6	86 ± 20

Voir tableau XXIV (*suite*) page suivante.

(1) Les très faibles quantités de Phe^3-ocytocine dont nous avons disposé ne nous ont pas permis d'employer des rapports de masse aussi élevés que dans les cas des autres analogues étudiés. Néanmoins, l'absence d'une inhibition significative pour des rapports de masse de 10 implique une perte importante d'affinité.

TABLEAU XXIV *(suite)*.

Exp. n°	Vasotocine dose (µg)	Rapport de doses : inhibiteur / hormone	% baisse C_{H_2O}/C_{in} : vasotocine seule	% baisse C_{H_2O}/C_{in} : vasotocine + inhibiteur	% inhibition
Analogue inactif : *Val*^{3}*-ocytocine*					
Peptide actif : *Arg*^{8}*-ocytocine*					
41	0,040	43	34	8	76
42	0,040	43	41	— 3	107
43	0,033	52	28	4	86
44	0,020	85	35	5	86
45	0,033	103	47	27	43
Moyennes :			37 ± 9	8 ± 18	80 ± 29
Peptide actif : *Lys*^{8}*-ocytocine*					
46	0,064	13	20	— 1	105
47	0,032	27	42	3	93
48	0,026	33	32	3	91
49	0,026	33	52	— 11	121
50	0,013	66	10	— 2	120
51	0,013	66	10	1	90
52	0,013	93	42	— 9	122
53	0,006	143	25	12	52
Moyennes :			29 ± 13	0 ± 6	99 ± 20
Analogue inactif : *Glu*$(NH_2)^5$*-ocytocine* (1)					
Peptide actif : *Lys*^{8}*-ocytocine*					
54	0,0021	25	34	10	71
55	0,0021	25	52	13	75
56	0,0021	50	34	8	77
57	0,0021	50	52	15	71
58	0,0021	100	56	15	77
59	0,0021	100	52	5	90
60	0,0021	100	34	3	91
Moyennes :			45 ± 10	10 ± 4	79 ± 7

Légende : voir tableau XXIII.

TABLEAU XXV. — *Inhibition par la Phe³-ocytocine, la Phe²-Phe³-Lys⁸-ocytocine et la Ser⁴-Ileu⁸-ocytocine de l'action de la vasotocine sur la réabsorption d'eau libre par le rein de la Grenouille.*

Exp. n°	Vasotocine dose (µg)	Rapport de doses inhibiteur / hormone	% baisse C_{H_2O}/C_{in} : vasotocine seule	% baisse C_{H_2O}/C_{in} : vasotocine + inhibiteur	% inhibition
Analogue inactif : Phe³-ocytocine					
Peptide actif : Lys⁸-ocytocine					
61	0,032	6	46	50	— 9
62	0,026	8	27	30	— 11
63	0,026	8	46	40	13
64	0,026	8	29	24	17
65	0,012	17	32	27	16
Moyennes :			36 ± 12	34 ± 13	5 ± 17
Analogue inactif : Phe²-Phe³-Lys⁸-ocytocine					
Peptide actif : Arg⁸-ocytocine					
66	0,033	25	58	56	3
67	0,033	25	47	27	43
68	0,033	25	28	32	— 14
69	0,033	25	32	28	12
70	0,033	25	29	30	— 3
Moyennes :			39 ± 20	35 ± 15	8 ± 27
Peptide actif : Lys⁸-ocytocine					
71	0,128	65	26	24	8
72	0,128	65	28	23	18
73	0,128	65	45	19	58
74	0,064	130	38	40	— 6
75	0,031	134	40	38	5
76	0,028	148	58	59	— 2
77	0,011	189	43	43	0
78	0,019	218	49	41	16
79	0,026	319	37	43	— 16
80	0,026	319	13	15	— 15
Moyennes :			38 ± 9	35 ± 10	6 ± 5
Analogue inactif : Ser⁴-Ileu⁸-ocytocine (1)					
Peptide actif : Lys⁸-ocytocine					
81	0,0017	40	45	50	— 11
82	0,0017	52	21	31	— 6
83	0,0054	52	21	33	— 47
84	0,0054	74	22	24	— 9
85	0,0054	104	32	25	22
Moyennes :			28 ± 14	33 ± 14	— 10 ± 30

Légende : voir tableau XXIII.

D. Résumé et conclusions.

Considérés du point de vue de leurs interactions avec les vasotocines, les 10 analogues étudiés se répartissent en deux groupes distincts. L'Ileu[8]-ocytocine, la dé-Leu[8]-ocytocine, la déamino-ocytocine, la Leu[3]-ocytocine, la Val[3]-ocytocine

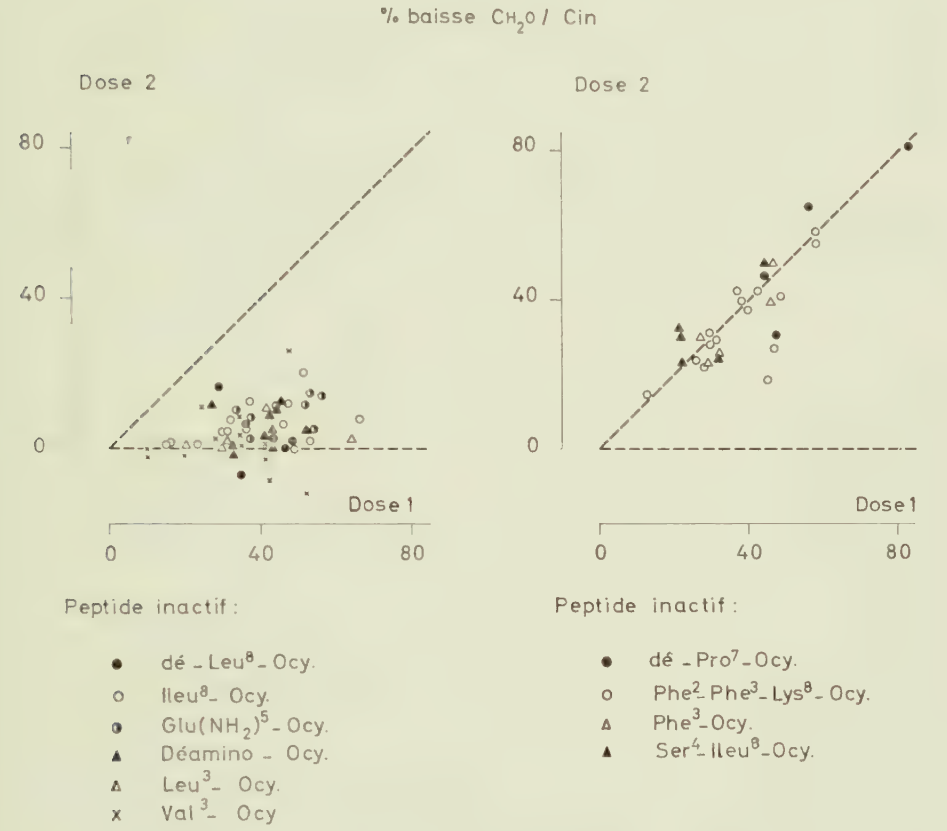


FIG. 30. — Action de la vasotocine sur la réabsorption tubulaire d'eau libre mesurée avant et après l'administration de 10 de ses analogues de structure.

En abscisses : l'effet produit par la vasotocine (arginine- ou lysine-vasotocine) injectée seule au début de l'expérience. En ordonnées : les effets d'une dose identique d'hormone injectée après l'administration de peptide inactif. Les effets sont mesurés par la baisse de la clearance relative de l'eau libre exprimée en p. 100 des valeurs témoins.

La distribution des points près de l'axe des abscisses dans un cas indique une inhibition marquée et, autour de la première bissectrice, dans l'autre cas, une absence d'inhibition.

et la Glu$(NH_2)^5$-ocytocine, d'une part, inhibent pratiquement complètement la baisse de la clearance relative de l'eau libre produite par l'injection de petites doses de vasotocine à la Grenouille ; alors que la dé-Pro[7]-ocytocine, la Phe[3]-ocytocine, la Phe[2]-Phe[3]-Lys[8]-ocytocine et la Ser[4]-Ileu[8]-ocytocine, d'autre part, ne modifient

pas de manière significative la réponse du rein à l'injection d'hormone. Dans nos conditions expérimentales, aucun de ces analogues n'a produit d'inhibition partielle. La différence entre ces deux groupes de peptides apparait clairement sur la figure 30 et dans le tableau XXVI. Sur la fig. 30, nous avons porté pour chaque expérience l'intensité de l'action de la vasotocine administrée en présence d'analogue inactif en fonction de l'intensité de la réponse à la même dose d'hormone injectée seule au début de l'expérience et ceci pour les analogues du premier groupe (partie gauche) et du second groupe (partie droite). La distribution des points expérimentaux : le long de l'axe des abscisses dans le premier cas indique une inhibition complète et autour de la première bissectrice, dans le second cas, une absence d'inhibition.

TABLEAU XXVI. — *Pourcentage d'inhibition de l'action de la vasotocine sur la réabsorption tubulaire d'eau libre par* 10 *de ses analogues de structure.*

Peptide inactif	Peptide actif	
	Arg^8-ocytocine	Lys^8-ocytocine
Ileu^8-ocytocine	84 ± 7 (5)	81 ± 14 (10)
dé-Leu^8-ocytocine	—	87 ± 24 (6)
Déamino-ocytocine	89 ± 12 (5)	79 ± 24 (5)
Leu^3-ocytocine	—	86 ± 20 (5)
Val^3-ocytocine	80 ± 29 (5)	99 ± 20 (8)
Glu(NH$_2$)^5-ocytocine	—	79 ± 7 (7)
dé-Pro^7-ocytocine	—	2 ± 54 (4)
Phe^3-ocytocine	—	5 ± 17 (5)
Phe$^{2-3}$-Lys^8-ocytocine	8 ± 27 (5)	6 ± 5 (10)
Ser^4-Ileu^8-ocytocine	—	— 10 ± 30 (5)

Les valeurs indiquées sont des moyennes accompagnées de leur intervalle de confiance au seuil de probabilité de 0,05. Pour chaque groupe, le nombre d'expériences est indiqué entre parenthèses. Les vasotocines et l'ensemble des analogues inactifs ont été désignés selon la terminologie classique par référence à la molécule d'ocytocine.

Dans le tableau XXVI, nous indiquons les valeurs moyennes du pourcentage d'inhibition calculées pour chaque type d'interaction étudié. Les valeurs obtenues pour les analogues du premier groupe sont toutes comprises entre 85 et 100 p. 100 alors qu'elles ne diffèrent pas significativement de 0 pour les analogues du second groupe. On remarquera, enfin, que l'intensité de l'inhibition observée est du même ordre de grandeur que l'on utilise l'arginine- ou la lysine-vasotocine comme peptide actif.

Le protocole expérimental employé ne permet pas de calculer avec précision le rapport des affinités respectives de l'analogue inactif et de la vasotocine pour

le récepteur tubulaire. Toutefois, une inhibition pratiquement complète obtenue pour certains analogues avec des quantités de peptides seulement 10 fois plus grandes que la dose de vasotocine employée implique que ceux-ci aient une affinité comparable à celle de la vasotocine ; dans d'autres cas, au contraire, une absence d'inhibition pour des rapports de masse de l'ordre de 100 implique une perte presque complète d'affinité.

CONCLUSION ET DISCUSSION DE LA DEUXIÈME PARTIE

Les résultats présentés dans les chapitres précédents suggèrent qu'une des premières étapes du mécanisme d'action de la vasotocine sur le rein de la Grenouille résulte d'une fixation réversible de cette hormone sur un récepteur cellulaire spécifique. Ils indiquent également que certains caractères structuraux de la molécule d'hormone, indépendants de ceux qui conditionnent son « affinité », semblent nécessaires pour conférer une activité biologique au complexe formé. Cette interprétation repose sur la mise en évidence d'une inhibition de type vraisemblablement purement compétitif de l'action de la vasotocine par des peptides de structure voisine.

Dans ce chapitre, nous nous proposons de discuter successivement les différents éléments de l'interprétation générale présentée et de replacer les résultats obtenus dans le cadre des travaux récents sur le mécanisme d'action des hormones neurohypophysaires.

Notre exposé sera orienté successivement sur la discussion des principaux problèmes suivants :

— spécificité de l'inhibition observée ;

— validité des critères employés pour définir sa nature compétitive ;

— signification biologique des concepts d' « affinité » et d' « activité » ;

— interprétation des corrélations mises en évidence entre la structure primaire de 12 analogues de structure de la vasotocine et leur affinité pour le récepteur de l'hormone naturelle.

Spécificité de l'inhibition observée.

Il est vraisemblable que l'inhibition observée résulte d'une interaction directe entre les analogues inhibiteurs et le récepteur de l'hormone naturelle ; les résultats présentés dans ce travail ne suffisent pas toutefois à la démontrer.

En effet, dans de telles expériences réalisées sur l'animal entier, tout facteur lié à l'injection d'inhibiteur et qui tendrait à diminuer la concentration de l'hormone effectivement active, pourrait rendre compte d'une inhibition de type apparemment compétitif.

Parmi les mécanismes susceptibles de conduire à une diminution de la concentration de l'hormone active, une inactivation de la vasotocine par combinaison directe avec certains de ses analogues inactifs ou la saturation par ces mêmes peptides d'un système de transformation de l'hormone indispensable à son action

ultérieure au niveau des organes effecteurs périphériques, méritent d'être discutées. En effet, Ressler (1958), a montré que des dimères de l'ocytocine pouvaient être obtenus *in vitro* par simple incubation dans une solution légèrement alcaline ; ces composés, qui résultent de la formation de ponts disulfures entre les parties N-terminales de deux molécules voisines, sont dépourvus d'activité biologique propre. La formation de dimères mixtes entre la vasotocine et ses analogues inactifs pourrait donc conduire à l'inhibition des actions de l'hormone. Toutefois, la formation de dimères n'a pas démontré *in vivo*, de plus, l'inhibition sélective par l'ocytocine des actions tubulaires de la vasotocine, alors que l'action glomérulaire est maintenue, l'absence complète d'interaction entre ces peptides sur les autres organes effecteurs de la vasotocine chez les Amphibiens : la peau (Morel et Bastide, 1964) ou la vessie (Rasmussen et coll., 1963) étudiées *in vitro* semblent exclure un tel mécanisme. L'hypothèse d'une transformation chimique préalable à l'action périphérique de la vasotocine est également rendue peu vraisemblable par le fait que cette hormone est active *in vitro* sur la vessie de Grenouille à des concentrations comparables à celles produisant *in vivo* et chez la même espèce, un effet antidiurétique marqué (Jard et coll., 1960).

Remarquons enfin qu'une action pharmacologique antagoniste des effets de la vasotocine sur le rein ne peut rendre compte des résultats observés. En effet, parmi l'ensemble des analogues produisant à fortes doses un effet diurétique et natriurique marqué, certains inhibent complètement l'action antidiurétique d'origine tubulaire produite par la vasotocine alors que les autres ne modifient pas les réponses du rein à de petites doses d'hormone. De plus, un tel mécanisme ne permettrait pas d'expliquer la complète réversibilité de l'inhibition produite par de fortes doses d'inhibiteur. Il semble donc raisonnable d'admettre que l'inhibition de l'action de la vasotocine par certains de ses analogues de structure, est localisée au niveau du récepteur rénal de l'hormone.

Validité des critères employés pour définir la nature compétitive de l'inhibition observée.

Plusieurs faits expérimentaux recueillis au cours de ce travail suggèrent que l'inhibition des actions de la vasotocine par certains de ses analogues résulte d'une fixation compétitive des peptides inhibiteurs sur le récepteur de l'hormone naturelle. Cette interprétation repose essentiellement sur la mise en évidence de l'identité des réponses biologiques maximales mesurées en présence et en l'absence d'ocytocine. Si ce critère est généralement considéré comme démonstratif de la nature compétitive de l'inhibition d'une réaction enzymatique simple étudiée *in vitro*, son application à un cas aussi complexe qu'une action hormonale mesurée sur l'animal entier mérite d'être discutée.

En particulier, l'identité des réponses maximales mesurées en présence ou en l'absence d'inhibiteur n'a de sens, dans l'interprétation que nous en donnons que dans la mesure où c'est effectivement la saturation du récepteur qui limite l'intensité de la réponse biologique finale produite par des doses élevées d'hor-

mone ; l'existence d'un facteur limitant différent situé dans la chaîne des réactions conduisant à l'action mesurée pourrait rendre compte de ces observations, même dans le cas d'une inhibition de type non compétitif. Remarquons cependant, dans cette hypothèse, qu'à la condition d'administrer l'inhibiteur en quantité suffisante, il serait toujours possible de limiter la réponse maximale mesurée en présence d'inhibiteur à une valeur inférieure à la réponse maximale de l'hormone seule. Or, comme nous l'indiquons dans le chapitre II, l'inhibition produite par l'administration de doses très élevées d'ocytocine est toujours complètement réversible par augmentation de la concentration de l'hormone injectée.

Enfin, l'analyse strictement quantitative des phénomènes observés est rendue difficile par le fait que les concentrations effectives de l'hormone ou de l'inhibiteur au niveau du rein ne sont pas accessibles à une mesure directe. De plus, le nombre de mesures réalisables sur le même animal au cours d'une expérience, est limité. Au demeurant, les grandes analogies de structure existant entre l'hormone naturelle et ses inhibiteurs constituent un argument important en faveur de la nature compétitive de l'inhibition observée.

Signalons à ce propos que plusieurs exemples d'inhibition des actions de l'ocytocine sur les contractions de l'utérus isolé de Rat et la pression artérielle des Oiseaux, ou de la vasopressine sur la pression artérielle du Rat, par des analogues de structure d'activité biologique propre très faible ou nulle, ont été décrits récemment. D'une manière générale, ces peptides inhibiteurs diffèrent des hormones naturelles par une modification des dimensions de leur molécule résultant : soit de l'incorporation d'un acide aminé supplémentaire comme dans le cas de : la 1.N-glycyl-ocytocine (du Vigneaud et coll., 1960), la 1.N-glycyl-lysine-vasopressine (Zaoral et Sórm, 1964), la 1.N-leucyl-ocytocine, la 1.N-phénylalanyl-ocytocine (Rychlik, 1964) et de la 2-tyrosine-ocytocine (Guttmann et coll., 1957 ; Berde et Cerletti, 1958), soit de la fixation sur l'un des acides aminés d'un groupement acétyle, méthyle ou éthyle : 1-N-acétyl-ocytocine, 1-N-acétyl-8-arginine-vasopressine (Studer et Cash, 1963), 1-N-acétyl-8-lysine-vasopressine (Cash et Smith, 1963), 1-N-carbamyl-ocytocine (Bisset, 1964 ; Bisset et coll., 1964), 2-o-méthyltyrosine-8-lysine-vasopressine, 2-o-éthyltyrosine-8-lysine-vasopressine (Zaoral et Sórm, 1964), 2-o-éthyltyrosine-ocytocine (Zhuse et coll., 1964), 2-o-méthyltyrosine-ocytocine (Law et du Vigneaud, 1960 ; Rudinger et Krejci, 1962), 4-isoglutamine-ocytocine (Ressler et Rachele, 1958), soit enfin de la suppression d'un acide aminé dans la chaîne latérale comme dans le cas de la 7-dé-proline-ocytocine, la 8-dé-leucine-ocytocine et la 9-dé-glycine-ocytocine (Jacquenoud et Boissonnas, 1962). Le mécanisme de l'inhibition des actions de l'ocytocine ou de la lysine-vasopressine par ces analogues — obtenue le plus souvent avec des quantités de peptide très élevées (jusqu'à 5 000 fois supérieures aux doses actives d'hormone) — n'a été précisé que dans un nombre restreint de cas. Ainsi, Krejci et coll. (1964) ont montré que la réponse maximale produite par la 2-o-méthyltyrosine-ocytocine sur l'utérus isolé de Rat est plus faible que la réponse produite par l'ocytocine elle-même. La différence observée est une fonction de la concentration du calcium dans le milieu de survie ; pour

les concentrations les plus faibles, la 2-o-méthyltyrosine-ocytocine a une activité pratiquement nulle mais a conservé une affinité importante pour le récepteur, car elle se comporte dans ces conditions comme un inhibiteur purement compétitif de l'ocytocine (Rudinger et Krejci, 1962).

Signification biologique des concepts d' « affinité » et d' « activité ».

La mise en évidence d'interactions de type compétitif entre les hormones neurohypophysaires et certains de leurs analogues de structure voisine implique l'existence d'un récepteur spécifique et conduit aux notions d'affinité et d'activité telles que nous les avons définies plus haut, et dont nous nous proposons maintenant de discuter la signification biologique.

En premier lieu, l'existence d'un récepteur spécifique des peptides neurohypophysaire localisé au niveau de leurs organes effecteurs, si elle n'a pas été démontrée expérimentalement, demeure néanmoins très vraisemblable. Il semble en effet difficile de rendre compte de la spécificité de ces hormones et de leur action à des concentrations extrêmement faibles sans admettre une interaction spécifique entre la molécule d'hormone et d'autres molécules de l'organe effecteur. D'ailleurs, l'utilisation d'hormones neurohypophysaires marquées au tritium a permis, dans un petit nombre de cas, de montrer une accumulation de la radioactivité localisée aux principaux sites d'action de l'hormone. Ainsi, Fong et coll. (1959) ont observé qu'après l'injection de vasopressine tritiée au Rat hydraté, une partie de la radioactivité peut être extraite avec les protéines du rein, prélevé au maximum de l'effet antidiurétique ; par des techniques analogues, Schwartz et coll. (1960) ont mis en évidence, *in vitro*, la fixation d'hormone marquée par la vessie de Crapaud. Dans les deux cas, la radioactivité peut être déplacée par incubation de l'extrait en présence de cystéine. Plus récemment, en étudiant la distribution d'ocytocine tritiée injectée au Rat, Aroskar et coll. (1964) ont observé que, 20 mn après l'injection, la concentration de la radioactivité est 20 fois plus importante dans le rein que dans le sang ; l'hypophyse, les glandes surrénales et le foie contiennent également une quantité notable de radioactivité. Par ailleurs, Darmady et coll. (1960), en recherchant par autoradiographie la présence de radioactivité sur des néphrons isolés de Rat après administration de vasopressine marquée à l'^{131}I, ont pu la localiser au niveau du tube contourné distal et des deux tiers supérieurs du canal collecteur, site d'action présumé de l'hormone antidiurétique sur le rein des Mammifères (Wirz, 1956).

Si la signification du concept d'affinité, qui traduit la fixation sélective des hormones neurohypophysaires au niveau de leurs organes effecteurs et rend compte de la spécificité de leur action, est directement compréhensible, la signification du concept d'activité semble, au contraire, plus difficile à définir.

Dans le modèle simple que nous proposions au chapitre II, l'hormone était assimilée au substrat spécifique de l'enzyme que serait le récepteur. Cependant, rien ne porte à croire que les hormones neurohypophysaires sont effectivement transformées au niveau de leurs organes effecteurs et que l'activité telle que nous

l'avons définie mesure la vitesse de décomposition du complexe hormone-récepteur en récepteur libre et produits de la réaction directement responsables de l'action biologique finale. Un tel mécanisme qui impliquerait une « consommation » des hormones neurohypophysaires hors de proportion avec les quantités normalement sécrétées ne rendrait pas compte, en outre, de leur rôle d'activateur de fonctions cellulaires préexistantes. Par analogie avec les systèmes régulateurs des chaînes métaboliques intracellulaires, mis en évidence au cours de ces dernières années (JACOB et MONOD, 1961 ; MONOD et JACOB, 1961 ; MONOD et coll., 1963) les hormones à action phasique telles que les hormones neurohypophysaires pourraient, par une interaction avec des molécules protéiques allostériques, jouer le rôle d'activateur de la chaîne de réactions conduisant à l'effet biologique final ; les hormones à action lente et soutenue ou à action morphogénétique telles que les hormones stéroïdes en particulier, pourraient jouer, par contre, le rôle d'inducteur de la synthèse de protéines spécifiques comme l'indiqueraient les travaux récents sur le mécanisme d'action de l'ecdysone (SEKERIS et KARLSON, 1964) ou de l'aldostérone (EDELMAN et coll., 1963). Dans cette hypothèse, l'action primaire des hormones neurohypophysaires pourrait résulter de modifications structurales des molécules de récepteur sur lesquelles elles se fixent sélectivement ; la recherche des caractères structuraux de la molécule hormonale requis pour sa fixation sélective sur un récepteur spécifique d'une part et pour son activité biologique finale, d'autre part, constitue l'une des méthodes d'étude indirecte du mécanisme de telles interactions.

Interprétation des corrélations existant entre la structure primaire de douze analogues de la vasotocine et leur affinité pour le récepteur de l'hormone naturelle.

Le tableau XXVII résume l'ensemble des résultats obtenus dans ce travail et rappelle la structure primaire de l'arginine-vasotocine et des analogues étudiés. L'analyse de ce tableau fait apparaître que :

1° l'arginine et la lysine-vasotocine sont les seuls peptides actifs sur le rein de la Grenouille ;

2° la suppression de l'acide aminé basique en position 8 ou son remplacement par la leucine ou l'isoleucine entraînent une perte complète d'activité sans modification de l'affinité, en effet : la 8-dé-leucine-ocytocine, l'ocytocine et la 8-isoleucine-ocytocine sont dépourvues d'activité antidiurétique chez la Grenouille mais se comportent comme des inhibiteurs compétitifs de la vasotocine ;

3° la suppression du groupement aminé terminal (déamino-ocytocine), le déplacement ou la suppression d'un groupement $-CH_3$ en position 3 (3-leucine-ocytocine et 3-valine-ocytocine) ainsi que son addition en position 5 (5-glutamine-ocytocine) sont compatibles avec le maintien d'une affinité élevée ;

4° au contraire, la présence de phénylalanine en position 3 (3-phénylalanine-

ocytocine et 3-phénylalanine-8-lysine-ocytocine) ou en position 2 et 3 (2 phénylalanine-3-phénylalanine-lysine-ocytocine), la présence de sérine en position 4 (4-sérine-8-isoleucine-ocytocine) et l'absence de proline en position 7 (7-dé-proline-ocytocine) s'accompagnent d'une perte très marquée de l'affinité pour le récepteur.

Ces résultats suggèrent que l'affinité de la vasotocine pour son récepteur est conditionnée par la structure de la partie cyclique N-terminale de sa molécule et est relativement indépendante de la structure de la chaîne latérale C-terminale.

En effet, seules des modifications mineures du cycle sont comptatibles avec le maintien d'une affinité élevée. Toutefois, la 7-dé proline-ocytocine dont le cycle a une composition identique au cycle de la molécule de vasotocine n'est pas inhibitrice ; de fait, il est probable que la présence de proline, acide aminé hétérocyclique confère une certaine rigidité à la molécule et que son absence retentisse sur la configuration de l'ensemble de la structure ; la 7-dé-proline-ocytocine n'a d'ailleurs qu'une activité biologique extrêmement faible sur l'ensemble des organes effecteurs étudiés (Jaquenoud et Boissonnas, 1962).

L'activité intrinsèque de la vasotocine semble dépendre de la structure de la chaîne latérale et, en particulier, de la présence d'un acide aminé basique en position 8. Toutefois, ces observations obtenues avec un petit nombre d'analogues ne permettent pas de généraliser les corrélations mises en évidence. Celles-ci sont d'ailleurs, en grande partie, propres au récepteur étudié. Ainsi, par exemple, le rein de la Grenouille diffère de manière très marquée de la peau, autre organe effecteur de la vasotocine étudié *in vitro* chez la même espèce par Morel et Bastide (1964). Sur ce récepteur, l'activité biologique apparaît relativement indépendante de la structure de la chaîne latérale, l'ensemble des analogues étudiés ne semblant différer que par leur affinité, tous produisent des réponses maximales identiques ; remarquons toutefois (tableau XXVII, dernière colonne) que les vasotocines et les peptides qui inhibent l'action de cette hormone sur le rein sont également ceux qui présentent l'affinité la plus grande pour le récepteur cutané.

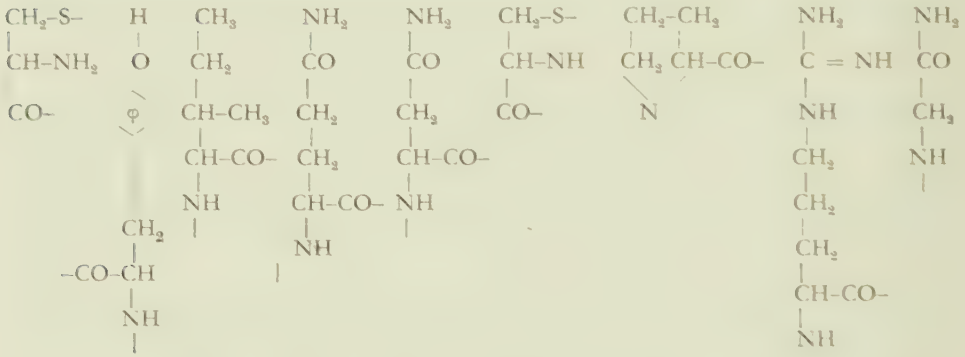
Il est peu probable cependant que de telles différences traduisent l'existence de deux mécanismes d'action de la vasotocine de nature différente sur ces deux récepteurs ; elles résulteraient plutôt de variations individuelles quant à la nature de leurs exigences stériques.

Remarquons également que les corrélations mises en évidence ne permettent pas de définir avec précision les sites de la molécule de vasotocine responsables de son activité. D'ailleurs, comme le remarquaient Rudinger et Jošt (1964 *a*), la structure primaire de telles molécules polypeptidiques ne renseigne nullement sur leur configuration spatiale ; des radicaux, largement séparés sur le schéma structural conventionnel, peuvent, de fait, se trouver très proches l'un de l'autre. Du point de vue de leurs interactions avec d'autres molécules, les hormones neurohypophysaires doivent être considérées comme des unités structurales caractérisées par une certaine forme et une distribution définie sur leur surface des principaux groupements fonctionnels ; et, en l'absence d'une connaissance précise

TABLEAU XXVII. — *Corrélation entre la structure et l'activité biologique ou les propriétés inhibitrices d'une série d'analogues de la vasotocine.*

ARGININE-VASOTOCINE (Arg^8-ocytocine)

(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)
cys	Tyr	Ileu	Clu(NH_2)	Asp(NH_2)	Cys	Pro	Arg	Gly(NH_2)

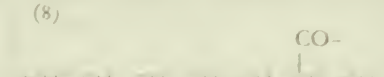
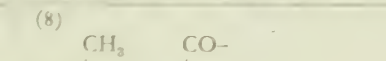
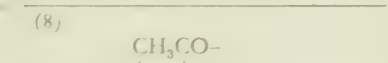
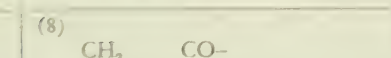
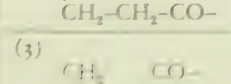
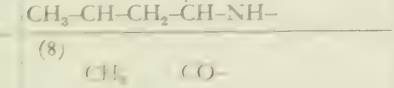
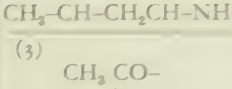
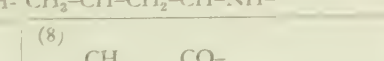
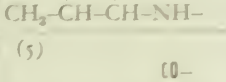
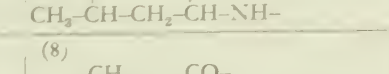
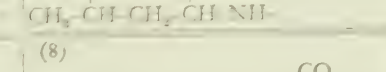
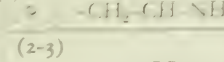
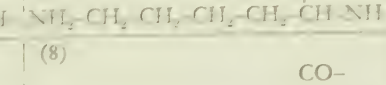
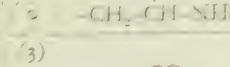
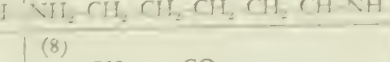
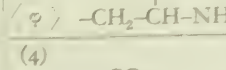
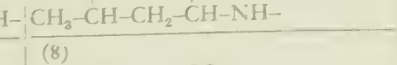


La partie gauche du tableau donne la séquence et la formule primaire des acides aminés constitutifs de l'arginine-vasotocine (Arg^8-ocytocine).

Pour chacun des analogues étudiés la formule primaire des acides aminés substitués (l'Arginine-vasotocine a été prise comme molécule de référence) dans le cycle ou la chaine latérale a été reproduite ; la position exacte de la substitution est indiquée entre parenthèses. L'activité antidiurétique chez la Grenouille a été exprimée par rapport à l'activité de l'arginine-vasotocine prise égale à 100.

* Valeurs obtenues par MOREL et BASTIDE (1964). Les activités natriférigues (stimulation du transport actif de sodium par la peau isolée de Grenouille sont exprimées en unités par mg de peptide ; une unité natriférique correspondant à l'activité d'une unité internationale d'ocytocine.

TABLEAU XXVII *(suite)*

Peptide	Formule des acides aminés substitués		Activité antidiurétique (Crémaschi)	Pouvoir inhibiteur	Activité natriurétique (1 mg) (*)
	A : dans le cycle	B : dans la chaine latérale			
Arg⁸-ocytocine	Peptide de référence	Peptide de référence	100		1 140
Lys⁸-ocytocine	—	(8) 	100		940
Ocytocine	—	(8) 	0		450
Ile³-ocytocine	—	(8) 	0	—	507
α-Leu⁸-ocytocine	—	(8) absence de leucine	0	—	660
Desamino-ocytocine	(1)	(8) 	0		190
Leu³-ocytocine	(3) 	(8) 	0		17.1
Val³-ocytocine	(3) 	(8) 	0		49
Glu(NH₂)⁵-ocytocine	(5) 	(8) 	0		2.6
Phe³-Lys⁸-ocytocine	(3)	(8) 	0		5.4
Phe²·³-Lys⁸-ocytocine	(2-3) 	(8) 	0	—	1.9
Phe³-ocytocine	(3) 	(8) 	0	—	1.76
Ser⁴-Ileu⁸-ocytocine	(4) 	(8) 	0	—	5.3
dé-Pro⁷-ocytocine	—	(7) absence de Proline	0	-	18.3

de la configuration moléculaire (1), une interprétation précise des corrélations entre structure et activité biologique est rendue difficile.

D'ailleurs, sur l'ensemble des organes effecteurs étudiés, aucun des groupements chimiques de la molécule d'hormone, susceptibles de donner naissance à des liaisons covalentes avec le récepteur, ne semble indispensable à l'activité biologique. En particulier, l'existence d'une activité biologique notable de trois analogues de l'ocytocine, dans lesquels un ou les deux atomes de soufre du pont disulfure de l'hormone ont été remplacés par un radical CH_2 (Rüdinger et Jošt, 1964 *b* ; Schwartz et coll., 1964) semble invalider l'hypothèse selon laquelle la fixation des hormones neurohypophysaires résulterait de la formation de ponts disulfures entre l'hormone et le récepteur par une réaction d'échange entre le pont —S—S— de la molécule hormonale et des groupements sulfhydriles (SH) libres du récepteur.

Cette hypothèse reposait sur le fait que la réduction de l'ocytocine conduisant à l'ouverture du pont disulfure entraîne une perte complète d'activité biologique (Ames et van Dyke, 1951 ; Audrain et Clauser, 1960) et que les agents bloquant les groupements -SH libres inhibent complètement l'action de la vasopressine sur la vessie de Crapaud (Rasmussen et coll., 1960).

(1) Peu de travaux ont été consacrés à l'étude de la structure secondaire ou tertiaire des hormones neurohypophysaires ; citons, à ce propos, les articles de Warner (1961) et de Craig et coll. (1964).

CONCLUSION GÉNÉRALE

Arrivé au terme de l'exposé de notre travail, nous nous proposons de résumer ici les principales conclusions auxquelles il nous a conduit, en insistant plus particulièrement sur celles qui nous paraissent constituer un apport original à l'étude du mécanisme d'action des hormones neurohypophysaires.

Les résultats présentés dans la première partie de notre travail décrivent les actions de l'arginine-vasotocine et de plusieurs de ses analogues sur le rein de la Grenouille hydratée ; ils nous ont conduit à préciser certaines particularités du fonctionnement rénal chez les Amphibiens.

Administrée en faibles doses à la Grenouille non anesthésiée et préparée de manière chronique, l'arginine-vasotocine produit :

1° un effet antidiurétique marqué qui résulte essentiellement d'une augmentation de la réabsorption d'eau libre et, pour une moindre part, d'une baisse du taux de filtration glomérulaire ;

2° une augmentation de la réabsorption tubulaire du sodium.

De nombreux arguments indirects indiquent que l'augmentation de la réabsorption tubulaire de l'eau libre et du sodium produite par l'arginine-vasotocine, résulte d'une action directe de l'hormone sur les cellules tubulaires. Celle-ci augmenterait le coefficient de perméabilité osmotique pour l'eau des cellules d'un segment distal des néphrons et stimulerait le flux net de réabsorption active de sodium dont elles sont le siège. Ainsi, des mécanismes communs rendraient compte de l'action de la vasotocine sur ses trois principaux organes effecteurs chez les Amphibiens, la peau, la vessie et le rein.

La mesure indirecte de la masse de tissu tubulaire actif au cours de l'action de la vasotocine montre que la baisse du taux de filtration glomérulaire produite par l'hormone résulte d'une diminution du nombre de glomérules fonctionnels ; ce mécanisme pourrait également rendre compte des larges variations de la filtration glomérulaire observées d'un animal à l'autre. La nature même des effets de la vasotocine et l'ordre de grandeur des doses mises en œuvre militent en faveur du rôle physiologique de cette hormone dans l'osmorégulation chez les Amphibiens.

Une stimulation par les hormones neurohypophysaires de la réabsorption active de sodium par le rein n'a été, à notre connaissance, clairement mise en évidence chez aucun autre groupe de Vertébrés. L'existence d'une telle action chez les Mammifères, en particulier, ne peut être exclue et l'étude de son rôle éventuel

dans les mécanismes de concentration de l'urine propres à ce groupe mériterait d'être poursuivie à la lumière des résultats obtenus chez la Grenouille.

En outre, ce travail met en évidence la très grande spécificité des actions tubulaires de la vasotocine chez la Grenouille. En effet, à l'exception de la 8-lysine-ocytocine qui, comme l'hormone naturelle, possède un acide aminé basique en position 8, aucun des peptides étudiés, qu'il s'agisse des hormones neurohypophysaires naturelles : ocytocine, vasopressine, isotocine, mésotocine ou d'analogues artificiels ne différant de la vasotocine que par la suppression ou la substitution d'un ou deux acides aminés dans la chaine peptidique, ne produisent, même administrés en doses très élevées, une augmentation de la réabsorption tubulaire d'eau libre et de sodium analogue à celle obtenue après l'injection à l'animal d'arginine- ou de lysine-vasotocine.

Le rein de la Grenouille présente une spécificité de réponse beaucoup plus marquée que celle des autres organes effecteurs des hormones neurohypophysaires généralement étudiés, et constitue, de ce fait, un matériel de choix pour l'étude d'interactions éventuelles entre peptides de structure voisine. Une étude systématique de ces interactions montre que l'ocytocine, la mésotocine, la déamino-ocytocine, la 3-valine-ocytocine, la 3-leucine-ocytocine, la 8-dé-leucine-ocytocine, la 5-glutamine-ocytocine inhibent l'action de la vasotocine sur le rein alors que la lysine-vasopressine, l'isotocine, la 3-phénylalanine-ocytocine, la 7-dé-proline-ocytocine et la 2-phénylalanine-3-phénylalanine-8-lysine-ocytocine ne modifient pas les réponses observées. Avec les analogues du premier groupe une inhibition pratiquement complète est obtenue avec des quantités d'inhibiteur de l'ordre de dix fois supérieures à la quantité d'hormone active utilisée, alors que pour les analogues du second groupe aucune inhibition n'est observée même avec des quantités de peptide très supérieures. Une étude plus précise des interactions entre l'ocytocine et la lysine-vasotocine montre que l'inhibition observée présente les principaux caractères d'une inhibition reversible de type purement compétitif telle qu'elle est définie dans le cas d'une réaction enzymatique simple ; en particulier, l'intensité des réponses maximales produites par de fortes doses d'hormone est identique, que la vasotocine soit administrée seule ou en présence d'ocytocine. Une analyse semi-quantitative de l'inhibition produite par l'ocytocine montre que l'affinité de ce peptide pour le récepteur tubulaire du rein de la Grenouille est comparable à celle de l'hormone naturelle, bien qu'il soit complètement dépourvu d'activité biologique propre.

Ces résultats constituent l'un des premiers exemples d'interaction de type compétitif entre les peptides neurohypophysaires et certains de leurs analogues de structure. La mise en évidence de tels phénomènes indique qu'une des premières étapes du mécanisme d'action de la vasotocine consisterait en sa fixation réversible sur un récepteur cellulaire spécifique vis-à-vis duquel elle présente une grande affinité. Elle implique, en outre, que la fixation de l'hormone sur son récepteur est une condition nécessaire mais non suffisante à l'accomplissement son de activité biologique finale.

L'étude des corrélations entre la structure primaire de 12 analogues de structure de la vasotocine et leurs propriétés inhibitrices montre que l'affinité de l'hormone pour son récepteur est étroitement dépendante de la structure de la partie cyclique N-terminale de la molécule alors que son activité biologique serait liée à la présence d'un acide aminé basique en position 8 dans la chaîne latérale. L'interprétation de ces corrélations semble difficile à formuler en l'absence d'une connaissance précise de la structure secondaire des peptides neurohypophysaires. Leur signification sur le plan du mécanisme moléculaire de l'action de ces hormones apparaît encore plus difficile à définir dans la mesure où elles traduisent vraisemblablement des caractères particuliers du récepteur étudié.

RÉSUMÉ

Dans ce travail, nous avons étudié les actions des hormones neurohypophysaires et de 9 de leurs analogues sur l'excrétion hydrominérale par le rein de la Grenouille. Nous avons également analysé les interactions existant entre ces peptides dans le but de définir les principaux caractères structuraux responsables de leur activité biologique.

Les expériences ont été réalisées chez la Grenouille non anesthésiée, préparée de manière chronique et placée dans des conditions d'hydratation contrôlées. L'intensité du taux de filtration glomérulaire et de la réabsorption tubulaire de l'eau et des électrolytes a été mesurée par la méthode des clearances comparées.

Administrée à la Grenouille, l'arginine-8-ocytocine (hormone naturelle chez cette espèce) produit à très faibles doses, de l'ordre de 10^{-11} M, une stimulation de la réabsorption tubulaire d'eau libre et de sodium associée à une diminution du taux de filtration glomérulaire. A l'exception de la lysine-8-ocytocine, aucun des autres peptides étudiés ne produit les actions caractéristiques de l'arginine-8-ocytocine. Tous les analogues comportant dans leur molécule une partie cyclique N-terminale identique ou très proche de celle de la molécule de l'hormone active inhibent de manière complète les actions tubulaires de cette dernière ; alors que ceux qui comportent une partie N-terminale différente de celle de la molécule d'arginine-8-ocytocine sont à la fois dépourvus d'activité biologique et de pouvoir inhibiteur. L'inhibition observée présente les principaux caractères d'une inhibition de type purement compétitif. De l'analyse de ces résultats, il a été conclu : 1° que l'action biologique finale de l'argine-8-ocytocine sur le rein de la Grenouille implique une fixation réversible de l'hormone sur un récepteur cellulaire spécifique pour lequel elle présente une grande affinité ; 2° que la fixation de l'hormone sur son récepteur serait dépendante de la structure de la partie cyclique N-terminale de sa molécule et que la présence d'un acide aminé basique en position 8 dans la chaîne latérale C-terminale serait indispensable pour conférer l'activité biologique au complexe ainsi formé.

SUMMARY

A study of the effects of vasotocin on water and electrolyte excretion by the frog kidney.

This work has studied the actions of the neurohypophysial hormones, and of nine of their analogues, upon water and salt excretion by the frog kidney. The interactions between these peptides have been analyzed in an attempt to define the chief structural characteristics responsible for their biological activity.

The experiments have been carried out on a non-anaesthetised chronic frog preparation under conditions of controlled hydration. Glomerular filtration rate, together with tubular reabsorption of water and electrolytes was measured by the comparative clearance method.

When the frog was given arginine^8-oxytocin (the natural hormone in this species), very small doses, of the order of 10^{-11} M, increased tubular reabsorption of free water and sodium, accompanied by a fall in glomerular filtration rate. With the exception of lysine^8-oxytocin, none of the other peptides studied produces the characteristic action of arginine^8-oxytocin. All the analogues having an N terminal cyclic portion in the molecule, identical with, or similar to that of the active hormone, completely inhibit the tubular activity of the latter. Those which have an N terminal portion differing from that of the arginine^8-oxytocin molecule have neither biological potency nor inhibitory effect. The observed inhibition shows the characteristics of a purely competitive type.

These results lead to the following conclusions :

1. The ultimate biological action of arginine^8-oxytocin on the frog kidney suggests a reversible fixation of hormone on a specific cellular receptor, for which it has a great affinity.

2. The fixation of hormone upon its receptor would depend upon the structure of the N-terminal cyclic portion of its molecule ; and the presence of a basic amino-acid in position 8 in the lateral C-terminal chain should be necessary to confer biological activity upon the complex so formed.

BIBLIOGRAPHIE

ABBRECHT, P. H. et MALVIN, R. L. (1960). Flow rate of urine as a determinant of renal countercurrent multiplier system. *Amer. J. Physiol.*, **199**, 919-922.

ACHER, E., CHAUVET, J., CHAUVET, M. T. et CREPY, D. (1961). Les hormones neurohypophysaires des Poissons : isolement d'une vasotocine du Tacaud (*Gadus luscus*, L.). *Biochim. biophys. Acta*, **51**, 419-420.

ACHER, R., CHAUVET, J., CHAUVET, M. T. et CREPY, D. (1962). Isolement d'une nouvelle hormone neurohypophysaire, l'isotocine, présente chez les Poissons osseux. *Biochim. biophys. Acta*, **58**, 624-625.

ACHER, R., CHAUVET, J., CHAUVET, M. T. et CREPY, D. (1964). Phylogénie des peptides neurohypophysaires : isolement de la mésotocine (Ileu^8-ocytocine) de la Grenouille, intermédiaire entre la Ser^4-Ileu^8-ocytocine des Poissons osseux et l'ocytocine des Mammifères. *Biochim. biophys., Acta*, **90**, 613-615.

ACHER, R., CHAUVET, J., LENCI, M. T., MOREL, F. et MAETZ, J. (1960). Présence d'une vasotocine dans la neurohypophyse de la Grenouille (*Rana esculenta*, L.). *Biochim. biophys. Acta*, **42**, 379-380.

AMES, R. G. et VAN DYKE, H. B. (1951). Thioglycollate inactivation of posterior pituitary antidiuretic principle as determined in the rat. *Proc. Soc. exp. Biol. N. Y.*, **76**, 576-578.

ANDERSEN, B. et USSING, H. H. (1957). Solvent drag on non electrolytes during osmotic flow through isolated toad skin and its reponse to antidiuretie hormone. *Acta physiol. scand.*, **39**, 228-239.

ARIENS, E. J. (1954). Affinity and intrinsic activity in the theory of competitive inhibition. Part I. Problems and Theory. *Arch. Int. Pharmacodyn.*, **99**, 32-50.

AROSKAR, J. P., CHAN, W. Y., STOUFFER, J. E., SCHNEIDER, C. H., MURTI, V. V. S. et DU VIGNEAUD, V. (1964). Renal excretion and tissue distribution of radioactivity after administration of tritium labelled oxytocin to Rats. *Endocrinology*, **74**, 226-232.

AUDRAIN, L. et CLAUSER, H. (1960). Mécanisme de l'inactivation de l'ocytocine par le tissu utérin. *Biochim. biophys. Acta*, **38**, 494-501.

BARNAFI, L., ROSAS, R., PEREDA, T. et CROXATTO, H. (1962). Effect of vasopressin structural modifications on Rat renal excretion of Na, K, and water. *Amer. J. Physiol.*, **202**, 593-596.

BENTLEY, P. J. (1958). The effects of neurohypophysial extracts on water transfer across the wall of the isolated urinary bladder of the toad *Bufo marinus*. *J. Endocr.*, **17**, 201-209.

BERDE, B. et CERLETTI, A. (1958). Quantitative comparison of substances related to oxytocin : a new test. *Acta Endocrin. Kbh.*, **27**, 314-319.

BERLINER, R. W. et DAVIDSON, D. G. (1957). Production of hypertonic urine in the absence of pituitary antidiuretic hormone. *J. clin. Invest.*, **36**, 1416-1427.

BIETER, R. N. (1930). The effect of the splanchnics upon glomerular blood flow in the frog's kidney. *Amer. J. Physiol.*, **91**, 436-460.

BISSET, G. W. (1964). The effect on milk-ejecting activity of modifying two functional groups in oxytocin. In : RUDINGER, J. ed., *Oxytocin, vasopressin and their structural analogues*. Pergamon Press, N. Y., 21-30.

BISSET, G. W., POISNER, A. M. et SMYTH, D. G. (1964). N. Carbamyl-oxytocin-a new analogue with inhibitory properties towards oxytocin and vasopressin. *J. Physiol., London*, **170**, 12 P-13 P.

BODANSKY, M. et DU VIGNEAUD, V. (1959). A method of synthesis of long peptides chains using a synthesis of oxytocin as an example. *J. Amer. chem. Soc.*, **81**, 5688-5691.

Boissonnas, R. A., Guttmann, St., Berde, B. et Konzett, N. (1961). Relationships between the chemical structure and the biological properties of the posterior pituitary hormones and their synthetic analogues. *Experientia Basel*, **17**, 377-390.

Bourguet, J. et Maetz, J. (1961). Arguments en faveur de l'indépendance des mécanismes d'action de divers peptides neurohypophysaires sur le flux osmotique d'eau et sur le transport actif de sodium au sein d'un même récepteur ; études sur la vessie et la peau de *Rana esculenta*, L. *Biochim. biophys. Acta*, **52**, 552-565.

Brooks, F. P. et Pickford, M. (1957). Conditions under which posterior pituitary hormones increase sodium and potassium excretion by the kidney. In : Heller, H. ed., *The Neurohypophysis*, Butterworths, London, 141-153.

Brooks, F. P. et Pickford, M. (1958). The effect of posterior pituitary hormones on the excretion of electrolytes in dogs. *J. Physiol., London*, **142**, 468-493.

Brunn, F. (1921). Beitrag zum Kenntniss der Wirkung von Hypophysenextrakten auf der Wasserhaushalt des Frosches. *Z. ges. exp. Med.*, **25**, 170-175.

Cash, W. D. et Smith, B. L. (1963). Synthesis and biological properties of 1-acetyl-8-lysine-vasopressin. *J. biol. Chem.*, **238**, 994-997.

Chauvet, J., Lenci, M. T. et Acher, R. (1960). Présence de deux vasopressines dans la neurohypophyse du Poulet. *Biochim. biophys. Acta*, **38**, 571-573.

Craig, L. C., Harfenist, E. J. et Paladini, A. C. (1964). Dialysis studies. VII : The behavior of Angiotensin, Oxytocin, Vasopressin and some of their analogues. *Biochemistry*, **3**, 764-769.

Darmady, E. M., Durant, J., Matthews, E. R., et Stranack, F. (1960). Location of ^{131}I pitressin in the kidney by autoradiography. *Clin. Sci.*, **19**, 229-241.

Edelman, I. S., Bogoroch, R. et Porter, J. A. (1963). On the mechanism of action of aldosterone on sodium transport: the role of protein synthesis. *Proc. nat. acad. Sci. Wash.*, **50**, 1169-1177.

Ewer, R. F. (1952). The effect of pituittrin on fluid distribution in *Bufo regularis* Reuss. *J. exp. Biol.*, **29**, 173-177.

Fong, C. T. O., Schwartz, I. L., Popenoe, E. A., Silver, L. et Schoessler, M. A. (1959). On the molecular bonding of lysine-vasopressin at its renal receptor site. *J. Amer. chem. Soc.*, **81**, 2592-2593.

Forster, R. P. (1938). The use of inulin and creatinine as glomerular filtrate mesuring substances in the frog. *J. cell. comp., Physiol.*, **12**, 213-222.

Forster, R. P. (1942). The nature of the glucose reabsorptive process in the frog renal tubule. Evidence for intermittency of glomerular function in the intact animal. *J. cell. comp. Physiol.*, **20**, 55-68.

Forster, R. F. (1943). The effect of epinephrine upon frog renal hemodynamics in the intact animal. *Amer. J. Physiol.*, **140**, 221-225.

Fuhrman, F. A. et Ussing, H. H. (1951). A characteristic response of the isolated frog skin potential to neurohypophyseal principles and its relation to the transport of sodium and water. *J. cell. comp. Physiol.*, **38**, 109-130.

Giebisch, G. (1958). Electrical potential measurements on single nephrons of *Necturus*. *J. cell. comp. Physiol.*, **51**, 221-240.

Guttmann, St. (1962). Synthèse de la Ser^4-Ile^8-ocytocine, une éventuelle hormone hypophysaire de certains Poissons (Isotocine). *Helv. chim. Acta*, **45**, 2622-2627.

Guttmann, St., Jaquenoud, P. A., Boissonnas, R. A., Konzett, H. H. et Berde, B. (1957). Ein Nonapeptid mit Oxytocin hemmeuden Eigenschaften. *Naturwissenchaften*, **44**, 632-633.

Heller, H. (1941). Differentiation of an (amphibian) water-balance principle from the antidiuretic principle of the posterior pituitary gland. *J. Physiol., London*, **100**, 124-141.

Heller, H. (1950). The comparative physiology of the neurohypophysis. *Experientia, Basel*, **6**, 368-376.

Heller, H. (1957). The metabolism and fate of the neurohypophysial principles. In : Heller, H. ed., *The neurohypophysis*, Butterworths, London, 77-94.

Heller, H. et Pickering, B. T. (1961). Neurohypophysial hormones of non-mammalian vertebrates. *J. Physiol., London*, **155**, 98-114.

HELLER, H., PICKERING, B. T., MAETZ, J. et MOREL, F. (1961). Pharmacological characterization of the oxytocic peptides in the pituitary of a marine teleost (*Pollachius virens*). *Nature, London*, **191**, 670-671.

HENDRIX, J. P., WESTFALL, B. B. et RICHARDS, A. N. (1936). Quantitative studies of the composition of glomerular urine. XIV. The glomerular excretion of inulin in frogs and necturi. *J. biol. Chem.*, **116**, 735-745.

HENRI, V. (1903). *Lois générales de l'action des diastases*. Hermann, Paris.

HOPE, D. B., MURTI, V. V. S. et DU VIGNEAUD, V. (1962). A highly potent analogue of oxytocin, desamino-oxytocin. *J. biol. Chem.*, **237**, 1563-1566.

HOSHIKO, T., SWANSON, R. E. et VISSCHER, M. B. (1956). Excretion of Na^{22} and K^{42} by the perfused Bullfrog kidney and the effect of some poisons. *Amer. J. Physiol.*, 184, 542-547.

JACOB, F. et MONOD, J. (1961). Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. molec. Biol.*, **3**, 318-356.

JANCSÓ, N. (1955). Storage of proteins and amylpolymers in histiocytes and in the renal epithelium. *Acta Med. Acad. Sci. Hungaricae*, **7**, 173-210.

JAQUENOUD, P. A. et BOISSONNAS, R. A. (1962). Synthèse de la dé-Pro^7-ocytocine, de la dé-Leu^8-ocytocine et de la dé-Gly^9-ocytocine. *Helv. chim. Acta*, **45**, 1462-1472.

JARD, S., MAETZ, J. et MOREL, F. (1960). Action de quelques analogues de l'ocytocine sur différents récepteurs intervenant dans l'osmorégulation de *Rana esculenta*. *C. R. Acad. Sci., Paris*, **251**, 788-790.

JARD, S. et MOREL, F. (1961). Inhibition compétitive de l'action antidiurétique de la lysine-vasotocine par l'ocytocine chez *Rana esculenta*. *C. R. Acad. Sci. Paris*, **252**, 339-341.

JARD, S. et MOREL, F. (1962 *a*). Comparative actions of vasotocin on salt and water excretion by the mammalian and the amphibian kidney. *Gen. comp. Endocr.*, **2**, Abstr. n° 33.

JARD, S. et MOREL, F. (1962 *b*). Actions of vasotocin and some of its analogues on salt and water excretion by the frog. *Amer. J. Physiol.*, **204**, 222-226.

JÖRGENSEN, C., BARKER, WINGSTRAND, K. G. et ROSENKILDE, P. (1956). Neurohypophysis and water metabolism in the toad *Bufo bufo*, L. *Endocrinology*, **59**, 601-610.

JOST, K., RUDINGER, J. et SORM, F. (1961). Amino-acids and Peptides. XXXV. Analogues of oxytocin modified in positions 1 and 2 of the peptide chain : protected intermediates. *Collection Czech. Chem. Commun.*, **26**, 2496-2510.

KATSOYANNIS, P. G. (1957). Oxypressin, a synthetic octapeptide amide with hormonal properties *J. Amer. chem. Soc.*, **79**, 109-111.

KATSOYANNIS, P. G. et DU VIGNEAUD, V. (1958). Arginine-vasotocin, a synthetic analogue of the posterior pituitary hormones containing the ring of oxytocin and the side-chain of vasopressin. *J. biol. Chem.*, **223**, 1352-1354.

KOEFOED-JOHNSON, V. et USSING, H. H. (1953). The contribution of diffusion and flow to the passage of D_2O through living membranes. Effect of neurohypophysial hormone on isolated anuran skin. *Acta physiol. scand.*, **28**, 60-76.

KONZETT, H. et BERDE, B. (1959). The biological activity of a new analogue of oxytocin in which the tyrosyl groupe is replaced by phenylalanyl. *Brit. J. Pharmacol.*, **14**, 133-136.

KREJCI, I., POLACĚK, KUPKOVA, B. et RUDINGER, J. (1964). Dose-response analysis of the action of some oxytocin analogues on the isolated uterus : the effect of ions. *In* RUDINGER, J. ed., *Oxytocin vasopressin and their structural analogues*. Pergamon Press N. Y., 1964, 117-123.

LANDGREBE, F. W., MACAULAY, M. H. E. et WARING, H. (1946). The use of Rats for pressor assays of pituitary extracts, with a note on response to histamine and adrenaline. *Proc. roy. Soc. Edinb.*, **62**, 202-210.

LAW, H. D. et DU VIGNEAUD, V. (1960). Synthesis of 2-p-methoxy-phenylalanine-oxytocin (O-Methyl-oxytocin) and some observations on its pharmacological behaviour. *J. Amer. chem. Soc.*, **82**, 4579-4581.

LEAF, A. (1960). Some actions of neurohypophysial hormones on a living membrane. *J. gen. Physiol.*, **43**, 175-189.

LEVINSKY, N. G. et SAWYER, W. H. (1953). Significance of the neurohypophysis in regulation of fluid balance in the frog. *Proc. Soc. Exp. Biol. N. Y.*, **82**, 272-277.

Lineweaver, H. et Burk, D. (1934). The determination of enzyme dissociation constants. *J. Amer. chem. Soc.*, **56**, 658-661.

Lucarain, C. (1962). Un dispositif semi-automatique pour la mesure des pressions omotiques. *Rev. franç. Et. clin. biol.*, **7**, 213-215.

Maetz, J. (1963). Physiological aspects of neurohypophysial function in fishes with some reference to the amphibia. *Symp. Zool. Soc. London*, **9**, 107-140.

Maetz, J., Bourguet. J., Lahlouh, B. et Hourdry, J. (1964). Peptides neurohypophysaires et osmorégulation chez *Carassius auratus*. *Gen. comp. Endocrin.*, **4**, 508-522.

Maetz, J., Morel, F. et Lahlouh, B. (1959 *a*). Natriferin : A new hormonal principle in the neurohypophysis of certain vertebrates. *Nature, London*, **184**, 1236-1237.

Maetz, J., Morel, F. et Race, B. (1959 *b*). Mise en évidence dans la neurohypophyse de *Rana esculenta*, L., d'un facteur hormonal nouveau stimulant le transport actif de sodium. *Biochim. biophys. Acta*, **36**, 317-326.

Marshall, E. K. (1932). The secretion of urea in the frog. *J. cell. comp. Physiol.*, **2**, 349-353.

Michaelis, L. et Menten, M. L. (1913). Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem. Z.*, **49**, 333-369.

Moellendorff, W. von (1930). Harn und Geschlechtsapparat. In : *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschens*. Springer, Berlin.

Monod, J., Changeux, J. P. et Jacob, F. (1963). Allosteric proteins and cellular control systems. *J. molec. Biol.*, **6**, 306-329.

Monod, J. et Jacob, F. (1961). General conclusions : Teleonomic mechanisms in cellular metabolism growth and differentiation. *Cold. Spr. Harb. Symp. quant. Biol.*, **26**, 389-420.

Morel, F. (1950). Mesure des échanges capillaires à l'aide des indicateurs radioactifs. *Helv. physiol. pharmacol. Acta*, **8**, 146-168.

Morel, F. (1955). Quelques aspects de la régulation endocrinienne de l'équilibre hydrominéral enregistrés chez le Rat à l'aide du radio-sodium Na^{24}. *Bull. biol. France Belg.*, suppl. XXXIX.

Morel, F. (1964). Action of neurohypophyseal hormones on the active transport of sodium. In : de Graeff et Leijnse, éd., *Water and electrolyte metabolism : II*, Elsevier, Amsterdam, 91-103.

Morel, F. et Bastide, F. (1964). Relationship between the structure of several analogues of oxytocin and their « natriferic » activity *in vitro*. In : Rudinger, J. éd., *Oxytocin, vasopressin and their structural analogues*. Pergamon Press, N. Y., 47-55.

Morel, F. et Bastide, F. (1965). Actions de l'ocytocine sur la composante active du transport de sodium par la peau de Grenouille. *Biochim. biophys. Acta.*, **91**, 609-611.

Morel, F. et Jard, S. (1963 *a*). Inhibition of frog (*Rana esculenta*) antidiuretic action of vasotocin by some analogues. *Amer. J. Physiol.*, **201**, 227-232.

Morel, F. et Jard, S. (1963 *b*). Experiments concerning the first steps of the mechanism of action of neurohypophysial hormones on the kidney. *Mem. Soc. Endocrin.*, **13**, 67-74.

Morel, F., Maetz, J., Acher, R., Chauvet, J. et Lenci, M. T. (1961). A « natriferic » principle other than arginine-vasotocin in the frog neurohypophysis. *Nature, London*, **190**, 828-829.

Morel, F., Maetz, J. et Lucarain, C. (1958). Action de deux peptides neurohypophysaires sur le transport actif de sodium et le flux net d'eau à travers la peau de divers Batraciens anoures. *Biochim. biophys. Acta*, **28**, 619-626.

Morel, F. et Serrel, F. (1949). Enregistrement graphique de la concentration d'un produit radioactif dans les liquides de l'organisme à l'aide d'un intégrateur mécanique. *C. R. Acad. Sci., Paris*, **229**, 447-449.

Rasmussen, H. et Craig, L. (1961). The isolation of arginine-vasotocin from fish pituitary glands. *Endocrinology*, **68**, 1051-1055.

Rasmussen, H. et Schwartz, I. L. (1962). The structural basis for the action of neurohypophyseal hormones upon the amphibian urinary bladder. *J. clin. Invest.*, **41**, 1293-1393.

Rasmussen, H., Schwartz, I. L., Schoessler, M. A. et Hochster, G. (1960). Studies on the mechanism of action of vasopressin. *Proc. Nat. Acad. Sci., Wash.*, **46**, 1278-1287.

RASMUSSEN, H., SCHWARTZ, I. L., YOUNG, R. et MARC-AURÈLE, J. (1963). Structural requirements for the action of neurohypophyseal hormones upon the isolated amphibian urinary bladder. *J. gen. Physiol.*, **46**, 1171-1189.

RESSLER, C. (1958). Inactivation of oxytocin suggesting peptide denaturation. *Science*, **128**, 1281-1282.

RESSLER, C. et RACHELE, J. R. (1958). Further properties of isoglutamine-oxytocin : inhibition of pressor activing of vasopressin. *Proc. Soc. exp. Biol. N. Y.*, **98**, 170-174.

RICHARDS, A. N., BARNWELL, J. B. et BRADLEY, R. C. (1927). The effect of small amounts of adrenalin upon the glomerular blood vessels of the frog's kidney perfused at constant rate. *Amer. J. Physiol.*, **79**, 410-432.

RICHARDS, A. N. et SCHMIDT, C. F. (1924). A description of the glomerular circulation in the frog's kidney and observations concerning the action of adrenalin and various other substances upon it. *Amer. J. Physiol.*, **71**, 178-208.

RICHARDS, A. N. et WALKER, A. M. (1935). Urine formation in the amphibian kidney. *Amer. J. Med.*, **190**, 727-746.

ROLF, D., SURTSHIN, A. et WHITE, H. L. (1950). A modified diphenylamine procedure for fructose and inulin determination. *Proc. Soc. Exp. Biol., N. Y.*, **72**, 351-354.

ROSAS, R., BARNAFI, L., PEREDA, T. et CRONATTO, H. (1962). Effect of oxytocin structural changes on rat renal excretion of Na, K and water. *Amer. J. Physiol.*, **202**, 901-904.

RUDINGER, J. et JOŠT, K. (1963 *a*). Synthetic analogues of oxytocin and vasopressin : structural relations. In : RUDINGER, J. éd., *Oxytocin, vasopressin and their structural analogues*. Pergamon Press, N. Y., 3-20.

RUDINGER, J. et JOŠT, K. (1964 *b*). A biologically active analogue of oxytocin not containing a disulfide group. *Experientia, Basel*, **20**, 570-573.

RUDINGER, J. et KREJCI, I. (1962). Dose-response relations for some synthetic analogues of oxytocin, and the mode of action of oxytocin on the isolated uterus. *Experientia, Basel*, **18**, 585-588.

RYCHLIK, I. (1964). Inactivation of oxytocin and vasopressin by tissue enzymes : a basis for the design of analogues. In : RUDINGER, J. éd., *Oxytocin, vasopressin, and their structural analogues*. Pergamon Press, N. Y., 153-162.

SAWYER, W. H. (1955). The hormonal control of water and salt metabolism with special reference to the amphibia. *Mem. Soc. Endocr.*, **5**, 44-56.

SAWYER, W. H. (1956). Increased renal reabsorption of water in the toad *Bufo marinus*, in response to dehydratation and toad neurohypophysial extract. *Bull. Mt Desert I. Biol. Lab.*, **5**,

SAWYER, W. H. (1957 *a*). The antidiuretic action of neurohypophysial hormones in Amphibia. In : HELLER, J. éd., *The neurohypophysis*. Butterworths, London, 171-182.

SAWYER, W. H. (1957 *b*). Increased renal absorption of osmotically free water by the toad (*Bufo marinus*) in response to neurohypophysial hormones. *Amer. J. Physiol.*, **189**, 564-568.

SAWYER, W. H., CHAN, W. Y. et VAN DYKE, H. B. (1962). Antidiuretic responses to neurohypophysial hormones and some of their synthetic analogues in dogs and rats. *Endocrinology*, **71**, 536-540.

SAWYER, W. H., MUNSICK, R. A. et VAN DYKE, H. B. (1959). Pharmacological evidence for the presence of arginine-vasotocin and oxytocin in neurohypophysial extracts from cold-blooded vertebrates. *Nature, London*, **184**, 1464-1465.

SAWYER, W. H. et SAWYER, M. K. (1952). Adaptative responses to neurohypophyseal fractions in vertebrates. *Physiol. Zool.*, **25**, 84-98.

SAWYER, W. H. et SCHISGALL, R. M. (1956). Increased permeability of the frog bladder to water in response to dehydratation and neurohypophysial extracts. *Amer. J. Physiol.*, **187**, 312-314.

SCHMIDT-NIELSEN, B. et FORSTER, R. P. (1954). The effect of dehydration and low temperature on renal function in the bullfrog. *J. cell. comp. Physiol.*, **44**, 233-242.

SCHWARTZ, I. L. et LIVINGSTON, L. M. (1964). Cellular and molecular aspects of the antidiuretic action of vasopressin and related peptides. *Vitam. and Horm.*, **22**, 261-358.

Schwartz, I. L., Rasmussen, H. et Rudinger, J. (1964). Activity of neurohypophyseal hormone analogues lacking a disulfide bridge. *Proc. nat. Acad. Sci., Wash.*, **52**, 1044-1045.

Schwartz, I. L., Rasmussen, H., Schoessler, M. A., Silver, L. et Fong, C. T. O. (1960). Relation of chemical attachment to physiological action of vasopressin. *Proc. nat. Acad. Sci., Wash.*, 46, 1288-1298.

Skadhauge, E. (1964). Effects of unilateral infusion of arginine-vasotocin into the portal circulation of the avian kidney. *Acta endocrin. Kbh.*, **47**, 321-330.

Sekeris, C. E. et Karlson, P. (1964). On the mechanism of hormone action. II. Ecdysone and protein biosynthesis. *Arch. Biochem.*, **105**, 483-487.

Smith, H. W. (1951). *The kidney. Structure and function in health and disease.* Oxford Univ. Press, N. Y., 1049 pp.

Snedecor, G. W. (1937). *Statistical methods applied to experiments in agriculture and biology.* Iowa State Univ. Press, Iowa, 5e ed., 1956.

Studer, R. O. et Cash, W. D. (1963). Synthesis of 1-acetyl-8-arginine-vasopressin and a study of its effects in the rat Pressor assay. *J. biol. Chem.*, **238**, 657-659.

Tramezzani, H. J. et Uranga, J. V. (1954). Variaciones de la substancia Comori-positiva y actividad antidiuretica en la neurohipofisis de sapos hidratos u deshidratos. *Rev. Soc. argent. Biol.*, **30**, 148-151.

Uranga, J. et Sawyer, W. H (1960). Renal responses of the bullfrog to oxytocin, arginine-vasotocin and frog neurohypophysial extracts. *Amer. J. Physiol.*, **198**, 1287-1290.

Ussing, H. H. (1954 *a*). Membrane structures as revealed by permeability studies. *7th Symp. Colston Res. Soc.*, Butterworths, London, 33-42.

Ussing, H. H. (1954 *b*). Active transport of inorganic ions. *8th Symp. exp. Biol., Cambridge*, 407-422.

Ussing, H. H. (1960). The frog skin potential. *J. gen. Physiol.*, **43**, 135-147.

du Vigneaud, V., Fitt, P. S., Bodansky, M. et O'Connel, M. (1960). Synthesis and some pharmacological properties of a peptide derivative of oxytocin : glycyl-oxytocin. *Proc. Soc. exp. Biol. N. Y.*, **104**, 653-656.

Walker, A. M., Hudson, C. L., Findley, T. J. et Richards, A. N. (1937). The total molecular concentration and the chloride concentration of fluid from different segment of the renal tubule of Amphibia : the site of chloride reabsorption. *Amer. J. Physiol.*, **118**, 121-129.

Warner, D. T. (1961). Proposed molecular models : II Conformations of Staphylomycin and other polypeptides and a possible relation to the structure of water. *J. theor. Biol.*, **1**, 514-528.

White, H. L. (1929). Observations on the nature of glomerular activity. *Amer. J. Physiol.*, **90**, 689-704.

Whittembury, G., Sugino, N. et Solomon, A. K. (1960). Effect of Antidiuretic Hormone and Calcium on the Equivalent Pore Radius of kidney Slices from *Necturus*. *Nature, Lond.*, **20**, 700-701.

Wirz, H. (1956). Der osmotische Druck in den corticallen Tubuli der Rattenniere. *Helv. physiol. Acta*, **14**, 353-362.

Wirz, H. (1957). The location of antidiuretic in the mammalian kidney. In : Heller, H. ed., *The neurohypophysis*, Butterworths, London, 157-159.

Zaoral, M. et Sorm, F. (1964). Preparation and biological activity of some new lysine-vasopressin analogues. In : Rudinger, J. éd., *Oxytocin, vasopressin and their structural analogues*. Pergamon Press N. Y., 167-171.

Zihuze, A. L., Jošt, K., Kasafirek, E. et Rudinger, J. (1964). Amino Acids and Peptids. XLV. Analogues of Oxytocin with O-ethyltyrosine, p-methylphenylalanine, and p-ethylphenylalanine replacing Tyrosine. *Collection Czech. Chem. Commun.*, **29**, 2648-2663.

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Action des stéroïdes hormonaux au niveau moléculaire.

Vu et approuvé :
Paris, le 21 *Décembre* 1965
Le Doyen de la Faculté des Sciences,
Marc ZAMANSKY.

Vu et permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie de Paris,
Jean ROCHE.